



Maintenance de la myéline périphérique : physiologie et physiopathologie

Adama Ouedraogo

► To cite this version:

Adama Ouedraogo. Maintenance de la myéline périphérique : physiologie et physiopathologie. Physiologie [q-bio.TO]. Université de Limoges, 2014. Français. NNT : 2014LIMO0043 . tel-01166028

HAL Id: tel-01166028

<https://theses.hal.science/tel-01166028>

Submitted on 22 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE SCIENCES –TECHNOLOGIE-SANTE
FACULTE DE MEDECINE

Département ou Laboratoire EA6309

ANNEE 2014

THESE N°

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie-Sciences-Santé

Spécialité : Neurosciences

Présentée et soutenue publiquement par

Adama OUEDRAOGO

Le 04 decembre 2014

À la Faculté de Médecine de Limoges

MAINTENANCE DE LA MYELINE PERIPHERIQUE : PHYSIOLOGIE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Directeur de thèse : Pr. Benoît FUNALOT, Université de PARIS-EST CRETEIL

Co-directeur de thèse : Pr. Franck STURTZ, Université de Limoges

Jury:

M. le Pr. Jean Philippe NEAU, Université de POITIERS (France).....Président
M. le Pr. Patrick MERTENS, Université LYON I-Claude Bernard (France)Rapporteur
M. le Pr. Alain CREANGE, Université PARIS-EST-CRETEIL (France).....Rapporteur
Mme le Dr Anne-Sophie LIA, Université de LIMOGES (France).....Examineur
M. le Pr. Franck STURTZ, Université de LIMOGES (France)Examineur
M. le Pr. Benoît FUNALOT, Université PARIS-EST-CRETEIL (France)Examineur

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Benoît FUNALOT pour la confiance placée en moi en me permettant de travailler sur cette thèse dont le sujet me passionne tant. Merci pour votre disponibilité, votre grande confiance en moi et vos précieux conseils. Merci de m'avoir guidé tout au long de cette thèse. Je vous remercie pour vos qualités humaines et professionnelles.

Je remercie Monsieur le Professeur Franck STURTZ pour son encouragement au travail bien fait. Merci pour les corrections du manuscrit qui ont beaucoup amélioré la qualité de ce document.

Je remercie mes rapporteurs, les Professeurs Alain CREANGE et Patrick MERTENS qui ont bien voulu juger ce travail. Soyez rassurés Messieurs, de mon plus profond respect.

Je remercie le Professeur Jean Michel Vallat de m'avoir soutenu lors de la recherche de financement pour la thèse.

Un grand merci au Docteur Yoanne Mousseau pour m'avoir initié à la culture cellulaire. Merci aussi pour les discussions académiques enrichissantes que nous avons eues.

Merci à Laurence Richard pour les diverses techniques expérimentales qu'elle m'a apprises. Vous avez toujours été présente pour m'aider dans mes techniques expérimentales. Je vous en remercie infiniment. Merci pour toute cette aide sur le plan humain et professionnel.

Un grand merci au Dr Sylvie BOURTHOUMIEU pour son aide.

Je tiens à remercier Madame Hélène DZUGAN, technicienne au laboratoire de biochimie médicale du Centre hospitalier Universitaire de Limoges pour m'avoir appris les techniques de biologie moléculaire. Merci pour tes qualités humaines et professionnelles. Merci de m'avoir soutenu aussi bien en master2 qu'au cours de cette thèse.

Il me tient à cœur de remercier également Madame Anne-Sophie Lia-Baldini, maître de conférence et praticien hospitalier à l'université et au CHU de Limoges pour sa gentillesse, ses conseils au sujet de mes travaux. Merci pour ton aide!

Mention spéciale à Angélique Nizou pour ses grandes qualités professionnelles et sa bonne humeur. Toujours prévoyante ! Nos réactifs sont toujours arrivés à temps, merci sincèrement.

Je remercie Mademoiselle Aurore DANIGO pour son aide et sa bonne humeur. Tu m'as toujours rendu service lorsque je te le demande. Je t'en remercie. Merci aussi pour l'entretien de ces nombreux rats.

Un grand merci au Docteur Séverine Mollard pour son soutien ! Tu m'as toujours apporté ton soutien quand j'en ai besoin, je t'en remercie sincèrement et te souhaite plein succès dans ton post-doc.

Je remercie le Docteur Nicolas Vedrenne, le Docteur Pierre Antoine Faye, le Docteur Marcela Otranto qui m'ont toujours rendu service, qui m'ont aidé au cours de cette thèse. Merci pour la bonne ambiance.

Je remercie Emilie et Fanny pour leur sympathie et leur aide.

Merci à Justine et à Jade, à Marion, à Maxime pour leur sympathie et leur aide. Merci pour votre soutien.

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont soutenu de près ou de loin durant cette thèse, notamment tout le personnel du laboratoire de biochimie médical et du laboratoire de Neurologie du CHU de Limoges.

Je dis merci à ma fiancée Zahratou qui, évidemment aurait souhaité que je sois à côté durant cette thèse mais à la fin, je pense, est fière du résultat.

Je remercie mon frère Noufou et sa famille pour leur soutien.

Enfin, un grand merci à mon père, à ma mère pour leur soutien indéfectible. Cette thèse est le fruit de leurs efforts. Merci infiniment !

Je remercie l'université de Limoges



Et

La région Limousin



Qui m'ont soutenu financièrement pendant la durée de cette thèse en m'attribuant une bourse régionale.

Abbreviations

04: lipid antigen

AAV8: adeno-associated virus type 8

ACh: Acétylcholine

AD: autosomique dominant

ADAM22: A Disintegrin And Metalloprotease 22

ADN: acide desoxyribonucléique

ADP: adenosine diphosphate

Ago 2: nucléase Argonaute 2

AP-1: activating protein-1

AP2 α : Activator Protein 2 alpha

AR: autosomique recessive

ARIA: Acetylcholine Receptor Inducing Activity

ARN: Acide ribonucléique

ARNi: ARN interference

ATP: adenosine triphosphate

BA: bourgeonnement axonal

BDNF: Brain-derived Neurotrophic Factor

BFABP: brain fatty acid-binding protein

pb: paire de base

BSA: bovine serum albumine

Cad19: Cadhérine 19

cAMP: cyclic adenosine monophosphate

Caspr: Contactin-associated protein

Caspr2: Contactin-associated protein 2

Cdc42: Cell division Cycle 42

cDNA: complementary Deoxyribonucleic acid

CEC: couplage excitation-contraction

CHD4: Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 4

CHN: congenital hypomyelinating neuropathy

CMT: Charcot-Marie-Tooth

CMT1: Charcot Marie Tooth disease type I

CMT2: Charcot Marie Tooth disease type II

CNTF: Ciliary neurotrophic factor

condPou3f1:MPZ(Cre): Pou3f1 conditional transgenic mouse

CpG-TLR9: Cytosine phosphate Guanine Toll- like receptor9

Cx29: Connexin 29

Cx32: Connexin 32

DDH: desert hedgehog

DDX20: DEAD box polypeptide 20

DG: dystroglycan

DHPR: Dihydropyridines

DI-CMT: CMT de type dominant et intermédiaire

DI-CMTB: Charcot marie tooth disease B dominant et intermédiaire

DNM2: dynamin2

Dok7: docking protein 7

dsDNA: double-stranded DNA

dsRNA: double-stranded RNA

DSS: Dejerrine sottas syndrome

DSSA: Dejerrine sottas syndrome A

DSSB: Dejerine sotthas syndrome B

E14: embryon days 14

ECM: Extracellular Matrix

EGR2: Early Growth Response2

ErbB1 ou **HER** ou **EGFR:** Human epidermal growth factor receptor 1

ErbB2 ou **HER2:** Human epidermal growth factor receptor 2

ErbB3: Human epidermal growth factor receptor 3

ET: endotheline

FAK: focal adhesion kinase

FGF: Fibroblast Growth Factor

Fig: Figure

GalC: galactosylceramidase

GAP43: Growth Associated Protein 43

GAS3: Human Growth arrest-specific gene 3

GDNF: glial cell derived neurotrophic factor

GFAP: Glial Fibrillary acidic protein

GGF: Glial Growth Factor

GJB1: Gap Junction Beta-1 protein

GJB3: gène de la connexin-31

Gpr126: g-protein coupled receptor 126

GTP: Guanosine triphosphate

HCF1: Host Cell Factor 1

HDAC1: Histone Deacetylase 1

HDAC2: histone deacetylase 2

HMG CoA: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase

HMG-box: the high-mobility group

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A réductase

HNK-1: Human Natural Killer-1

HRG: Heregulin

HSPB1 or **HSP27**: heat shock protein B1.

IGF: insulin-like growth factor

J1: premier jour postnatal

KIF1B: kinesin family member 1B

KO: knock-out

LIF: Leukemia Inhibitory Factor

Lig4: ligase IV, DNA, ATP-dependent

LITAF: Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor

LNGFR: Low- affinity nerve growth factor receptor

MAG: Myelin-associated Glycoprotein

MAL: myelin and lymphocyte protein

MBP: Myelin Basic Protein

MCP: monocyte chemoattractant protein-1

MFN2: mitofusine2

miARN: micro ARN

MLL H3K4: The mixed-lineage leukemia methylation of lysine 4 of histone 3

MPZ ou **P0**: myelin protein zero

mSCE: myelin associated Schwann cell enhancer

MuSK: muscle skeletal receptor tyrosine kinase

Ncad: N-cadherin

NCAM (L1): Neural Cell Adhesion Molecule

NDF: Neu Differentiation Factor

NEFL : neurofilament light chain gene

NFkB: Nuclear Factor-KappaB

NgCAM: neuron-glia cell adhesion molecule

NGF: Nerve Growth Factor

NHHP: neuropathie héréditaire avec hypersensibilité à la pression

NHMS: Neuropathie héréditaire motrice avec déficit sensitive

NHSA: neuropathie héréditaire sensitive et autonome

NMH: neuropathie motrice héréditaire distale

NrCAM: Neuronal cell adhesion molecule

NRG1: Neureguline1

NT3: neurotrophine 3

NuRD: The nucleosome remodeling and histone deacetylase

NVC: neovascularisation choroïdienne

Oct6 (Pou3f1): organic cation/carnitine transporter 6

P65: transcription factor p65

P75^{NTR}: p75 neurotrophin receptor

PAZ: Piwi/Argonaute/Zwille

PBS: phosphate buffer saline

PDGF: platelet-derived growth factor

pDNA: plasmid DNA

PIDC: Polyradiculonévrite Inflammatoire Démyélinisante Chronique

PKA: protéine kinase A

PKR: Protein Kinase R

PLP: proteolipid protein

PMD: Pelizaeus-Merzbacher disease

PMP22: Peripheral Myelin Protein 22 kDA

POU3F1 (Oct-6): POU class 3 homeobox 1

Pou3f2 (Brn2): POU class 3 homeobox 2

POU6F1: POU class 6 homeobox 1

PRX: periaxin

RAB7: RAS-associated GTP-binding protein gene

Rac1: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

RACH: Récepteur d'acétylcholine

RER: reticulum endoplasmique rugueux

RET: récepteur à activité tyrosine kinase

RISC: RNA-induced silencing complex

RS: reticulum sarcoplasmique

RT-qPCR: Real Time quantitative polymerase chain reaction

RyR: Ryanodine

Scip: suppressed cAMP-inducible POU

SCP: Schwann Cells Precursors

SCP-like cells: Schwann cells precursors like cells

Ser276: serine 276

shRNA: short hairpin RNA

siRNA: small interfering RNA

SMARD: neuropathie axonale grave infantile avec insuffisance respiratoire

SMDF: Sensory and motor neuron-derived factor

SNC : Système Nerveux Central

SNP : Système Nerveux Périphérique

Sox10: SRY-box containing gene 10

Sox11: SRY-box containing gene 11

Sox2: SRY-box containing gene 2

SREBP: Sterol regulatory element binding proteins

Tg80: Transgenic line 80

TGF β : Transforming Growth Factor β

TLR3: Toll-like receptor-3

TLR9: Toll-like receptor 9

Tr: Trembler

Tr-J: Trembler J

UM: unité motrice

UPR: a canonical unfolded protein response

VEGFA: vascular endothelial growth factor A

VEGFR1: vascular endothelial growth factor receptor 1

YARS: tyrosyl-tRNA synthetase

Table des matières

AVANT PROPOS	1
DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	4
PARTIE I : PHYSIOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE.....	4
I. CELLULES ET INTERACTIONS DANS LE SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE	4
A. La cellule de Schwann.....	4
1. Introduction sur la cellule de Schwann	4
2. Le développement des cellules de Schwann	5
3. Les différentes étapes de développement des cellules de Schwann : Analyse de la lignée schwannienne.....	8
a. Les cellules de la crête neurale et les précurseurs des cellules de Schwann ..	11
b. Molécules clés des cellules de Schwann immatures, myélinisantes et non myélinisantes et maladies associées au dysfonctionnement de chacune d'elle.....	16
4. La lame basale des cellules de Schwann	19
5. La régulation de la fonction des cellules de Schwann par les laminines et les récepteurs des laminines.....	20
a. Les laminines dans le système nerveux périphérique.....	20
b. Les récepteurs des laminines dans le système nerveux périphérique	22
c. La signalisation des laminines dans la prolifération des cellules de Schwann	22
6. Influence des cellules de Schwann sur la cellule nerveuse	23
a. Les cellules de Schwann régulent le développement neuronal	23
b. Régulation postnatale de la relation entre les cellules de Schwann myélinisantes et neurones.....	25
7. Contrôle du développement et de la différenciation des cellules de Schwann ..	26
a. Rôle de la neureguline	26
b. Rôle de Notch	28
c. Rôle de TGFβ	29
B. La cellule nerveuse.....	29
1. Classification fonctionnelle des neurones	30
C. L'influx nerveux.....	32
D. La synapse et les neuromédiateurs.....	33
1. La synapse	33
2. Les neuromédiateurs	34
II. LA MYELINE	35
A. Les protéines myéliniques	36
1. MBP	37
2. P0.....	38

3.	PMP22	39
a.	L'expression de PMP22 est stimulée par la progestérone au cours de la myélinogenèse in vitro	41
b.	PMP22 se déplace à la membrane plasmique des cellules de Schwann après la formation de la lame basale.....	42
c.	Le profil d'expression temporelle de PMP22 est similaire à celui de P0 au cours de la myélinisation in vivo.....	43
	III. Les Nœuds de Ranvier : structure et fonctionnement	43
	Chapitre I: Les regulateurs de la myélinisation	45
	I. Répression génique au cours de la myélinisation	45
	A. Le contrôle transcriptionnel de la myélinisation	45
	Chapitre II: Maintenance de la myéline peripherique/ Les regulateurs de la maintenance	49
	I. La signalisation de ErbB2 dans les cellules de Schwann est indispensable pour la maintenance des nerfs périphériques myelinisés et la prolifération des cellules de Schwann après une lésion	49
	II. Sox10 est requis pour l'homeostasie des cellules de Schwann et la maintenance de la myéline dans les nerfs peripheriques adultes	50
	A. L'ablation conditionnelle de Sox10 chez les souris adultes entrainent des symptômes neurologiques et des altérations dans la vitesse de conduction du nerf périphérique.....	50
	B. L'ablation conditionnelle de sox10 chez des souris adultes entraine des alterations dans la structure du nerf périphérique	51
	III. Krox20 (Egr2) est indispensable pour la maintenance de la myéline périphérique	52
	A. Sa mutation conditionnelle entraine une absence de myélinisation	52
	B. Krox20 est requis pour la maintenance de la myéline périphérique	54
	C. Le KO conditionnel de Krox20 entraine une accumulation des cellules de Schwann immatures et une augmentation de la prolifération	56
	IV. LES NERFS PERIPHERIQUES	57
	A. Le nerf normal	57
	1. Organisation générale du nerf périphérique	57
	2. Structure et physiologie de l'axone	59
	3. Jonction neuromusculaire et transmission neuromusculaire	60
	4. Le phénomène de la contraction musculaire	62
	5. Mécanisme de formation synaptique.....	66
	B. Le nerf traumatisé.....	68
	1. Physiologie du nerf traumatisé	68
	a. Mécanismes physiopathologiques	68
	2. Dégénérescence nerveuse.....	69

3.	Mécanismes de réparation neuronale	70
a.	Bourgeonnement axonal	70
b.	Facteurs neurotrophiques.....	72
c.	Conséquences fonctionnelles potentielles	73
V.	LES EFFECTEURS SCHWANNIENS DE LA MAINTENANCE MYELINIQUE/ LES REGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS MAJEURS DU PROCESSUS DE MYELINISATION ET DE DEMYELINISATION.....	74
A.	Coordination des processus de myélinisation	75
1.	La régulation d'Oct-6/ Scip.....	76
2.	Le rôle de Sox10 dans les cellules de Schwann myélinisantes	77
B.	Régulation transcriptionnelle de la démyélinisation	78
1.	Rôle de C-Jun	79
2.	La démyélinisation résulte d'un retard de développement.....	80
3.	La démyélinisation est un phénomène parallèle au dosage et à la surexpression de MPZ.....	81
4.	Krox20/Egr2 et gènes semblables	82
a.	L'expression du gène Egr2 est activée par le facteur de transcription sox10.	82
C.	Les régulateurs négatifs de la myélinisation	83
1.	La surexpression de Pou3f1 conduit à une hypomyélinisation persistante et une perte axonale dans le système nerveux périphérique	85
2.	Une expression constitutive de pou3f1 entraine une expression aberrante de gène de myéline malgré des niveaux normaux d'Egr2	87
a.	Régénération du nerf et facteur de transcription	88
D.	La signalisation neuro-gliale et la protection de la fonction des axones par les cellules de Schwann	89
VI.	Les siARN : ROLE ET MECANISME D'ACTION	90
A.	L'induction de l'ARNi : la phase d'initiation	90
B.	L'utilisation in vivo de molécules de siARN	92
C.	Efficacité de la transfection <i>in vitro</i> de siARN	92
D.	Les molécules de siRNA thérapeutiques	93
E.	Spécificité de l'effet des siARN	94
PARTIE II : PHYSIOPATHOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE .	96	
I.	MYELINE ET NEUROPATHIES PERIPHERIQUES HUMAINES	96
A.	GENERALITES SUR LES NEUROPATHIES PERIPHERIQUES	96
1.	Aperçu sur les différentes appellations des différents types de neuropathies périphériques	97
2.	Dans quel cas affirmer une neuropathie	98
3.	Les types lésionnels.....	98
4.	Neuropathies démyélinisantes.....	99

5.	Neuropathie axonale.....	99
a.	Forme sensitive pure.....	100
b.	Formes motrices pures.....	101
6.	Examens complémentaires en cas d'un tableau clinique de neuropathie périphérique.....	101
a.	Examen électrophysiologique.....	101
b.	Examen biologique	101
7.	Biopsie nerveuse	102
8.	Enquête étiologique.....	102
A.	LES DIFFERENTS TYPES DE NEUROPATHIES	103
1.	LES NEUROPATHIES HEREDITAIRES : CAS PARTICULIER DE LA MALADIE DE CHARCOT MARIE TOOTH.....	103
a.	GENERALITES	103
b.	CMT1 : dominante et démyélinisante	105
c.	Une forme spéciale : Neuropathie héréditaire avec hypersensibilité à la pression.....	107
d.	La neuropathie héréditaire motrice et sensitive ou CMT2 : Dominante, axonale	108
e.	CMT intermédiaire : dominant, intermédiaire.....	110
f.	CMTX1 : lié à X, dominant et démyélinisant	111
g.	CMT3 : le syndrome de Dejerrine-Sottas.....	112
h.	Classification des différents types de CMT et mutations impliquées	113
B.	Implications des protéines myéliniques dans des neuropathies héréditaires.....	114
C.	Thérapie des myelinopathies périphériques humaines sur la base de la transcription 115	
II.	PROBLEMATIQUE DE LA THESE	115
	RESULTATS ET DISCUSSION	117
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	118
	Bibliographie.....	120
	Fiches techniques.....	151
	Fiche technique N°1: Protocole d'extraction d'ARNm de culture cellulaire.....	151
	Fiche technique n°2 : Protocole d'extraction d'ARNm de nerf sciatique de rat.....	152
	Fiche technique N°3 : Protocole de RT-PCR.....	153
	Fiche technique n°4 Protocole de quantification d'ARNm à partir des cDNA	154
	Fiche technique N°5 Protocole d'immunomarquage de la protéine MBP (Myelin Basic Protein)	155
	Fiche technique N°6 : Protocole de dissection des ganglions rachidiens postérieurs d'embryons de rat.....	156
	Fiche technique n°7 Protocole de coating des plaques au matrigel	157

Fiche technique N°8 Digestion des DRG.....	157
Fiche technique N°9 Ensemencement et nutrition des cellules.....	157
Fiche technique n° 10: Technique de fixation de nerf sciatique de rat pour une observation au microscope électronique	158
Fiche technique n°11 : Technique d'inclusion en araldite de nerf sciatique de rat....	158
Fiche technique n°12 : Injection de siARN dans les nerfs de rat.....	159

Liste des figures

Figure1 : Phénotype caractéristiques des étapes clés du développement embryonnaire.....	10
Figure2 : La lignée des cellules de Schwann.....	13
Figure3 : Précurseurs des cellules de Schwann et cellules de Schwann immatures.....	14
Figure4 : Changement de l'expression moléculaire quand les cellules de Schwann commencent à former des cellules myélinisantes et non myélinisantes.....	16
Figure5 : Schéma détaillé des différentes étapes de différenciation des cellules de Schwann en cellules myélinisantes ou non myélinisantes.....	18
Figure6 : Phénotype des mutants erbB2 et 3.....	24
Figure7 : schéma d'un neurone.....	30
Figure8 : circulation de l'influx nerveux.....	30
Figure9 : neurone sensitif.....	31
Figure10 : neurone moteur.....	32
Figure11 : Conduction saltatoire de l'influx nerveux.....	33
Figure12 : Les synapses.....	34
Figure13 : Formation de la gaine de myéline.....	35
Figure14 : Représentation schématique des trans-interactions de PMP22 et P0.....	
Figure15: Coupe longitudinale d'un nœud de Ranvier.....	44
Figure16: Grandes lignes d'un réseau de régulation de gènes de myéline.....	45
Figure17 : Régulateurs de la myélinisation.....	46
Figure18 : Sites fonctionnels de Krox20.....	47
Figure19. Coupe axiale d'un nerf périphérique.....	58
Figure20 Représentation schématique de l'agencement moléculaire de certaines protéines concentrées à la jonction neuromusculaire.....	62
Fig.21 : Sites de fixation de l'ATP.....	65
Fig 22 : Schéma de silençage de gènes par siRNA et shRNA.....	93

AVANT PROPOS

Mon travail de thèse a débuté en Octobre 2010 au sein du laboratoire de biomolécules et thérapies anti-tumorales EA 4021 dirigé par le Pr. Franck Sturtz et s'est poursuivi dans la nouvelle équipe EA 6309 créée en 2011, dédiée à la maintenance myélinique et neuropathies périphériques et dirigée par le Pr. Benoît FUNALOT. C'est dans cette nouvelle équipe que ma thèse a été spécifiquement faite, une équipe spécialisée dans la recherche sur les maladies des nerfs périphériques. Les principaux objectifs de cette équipe est de chercher à comprendre les mécanismes de la maintenance de la gaine de myéline périphérique, dans ses aspects physiologiques et pathologiques en considérant la cellule de Schwann (cellule myélinisante du nerf périphérique), les relations entre cellules de Schwann et axones et les relations entre cellules de Schwann et matrice extracellulaire puis de caractériser les dysfonctionnements du processus en situation pathologique (neuropathies génétiquement déterminées ou neuropathies acquises, en particulier inflammatoires chez l'homme malade et dans des modèles animaux). Cette équipe s'intéresse également aux recherches à visée thérapeutique dans les neuropathies périphériques qui comprennent la mise au point de modèles (en particulier cellulaires) de neuropathies démyélinisantes, dans le but de les utiliser pour tester différentes approches thérapeutiques, comme l'utilisation d'hydrogels pour la libération prolongée de molécules actives.

Le système nerveux périphérique est la partie du système nerveux qui fait circuler l'information entre le système nerveux central et les organes. Il est formé des ganglions et des nerfs périphériques. Les pathologies impliquant un dysfonctionnement des nerfs périphériques sont nombreuses, certaines sont liées à une atteinte de l'axone de la cellule nerveuse et d'autres à une atteinte de la gaine de myéline. La myéline est indispensable pour la propagation saltatoire de l'influx nerveux dans le système nerveux périphérique.

Les dysfonctionnements persistants de la myéline périphérique résultent éventuellement d'une dégénérescence axonale et une perte sensitive dans des maladies telles que les neuropathies démyélinisantes héréditaires comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (Warner et al., 1999a; Houlden et Reilly, 2006).

La mise en place de la gaine de myéline et son maintien du point de vue fonctionnel nécessite l'expression constante de facteurs de transcription.

La haute vitesse de conduction des fibres nerveuses est une caractéristique des vertébrés supérieurs et dépend de spécialisations structurelles et moléculaires mises en place au cours du

développement. Ces spécialisations se produisent entre les neurones et ses cellules gliales associées, ce qui permet la formation de la gaine de myéline, importante structure membranaire qui entoure et isole les axones (Arroyo et Scherer, 2000; Fields et de Stevens-Graham, 2002; Mirsky et al. 2002). Deux types de cellules gliales produisent la myéline: les oligodendrocytes dans le système nerveux central et les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique. Bien qu'organisée de façon similaire, la composition moléculaire de la myéline du système nerveux central et périphérique présente des différences significatives de telle sorte que les cellules de Schwann et oligodendrocytes ont besoin d'ensemble de régulateurs transcriptionnels différents pour coordonner la myélinogenèse. Durant les premiers jours du développement postnatal, de nombreuses cellules de Schwann établissent une relation 1:1 avec les axones, cessent de proliférer et initient la formation de la myéline de manière qu'à l'issue de la première semaine postnatale, tous les axones à myéline compétente sont activement myélinisés, les cellules de Schwann qui restent associées à des fibres de plus faibles calibres se séparent de ces fibres sans les avoir myélinisées (Webster 1993). Des informations significatives ont été accumulées ces dernières années sur les facteurs de transcription impliqués dans la différenciation des cellules de Schwann ainsi que le processus de myélinisation. Ces facteurs de transcription incluent EGR2, Sox10 et le domaine de la protéine POU: Pou3f1 (Oct-6), Scip, Tst-1 (Topilko et Meijer 2001; Jaegle et al. 2003). Des expériences en ciblant des gènes chez la souris ont permis d'identifier le rôle fonctionnel de ces facteurs et l'ordre possible de leur action.

Sox10 est nécessaire au début du développement pour l'établissement et/ ou l'entretien des précurseurs des cellules de Schwann de la crête neurale (Britsch et al. 2001). Au cours des stades suivants du développement, Oct6 et Krox20 sont tous les deux impliqués dans la différenciation des cellules de Schwann myélinisantes. La mise en place et le maintien d'une gaine de myéline fonctionnelle est indispensable durant toute la vie entière (plusieurs décennies). De nombreuses publications existent sur le processus de myélinisation mais peu sur la maintenance d'une gaine de myéline fonctionnelle.

Il a été déjà mis en évidence in vivo qu'EGR2 est un facteur de transcription qui assure la maintenance de la myéline périphérique (Decker et al., 2006).

L'objectif de ma thèse est d'identifier in vitro mais aussi in vivo les (des) facteurs impliqués dans cette maintenance myélinique par transfection de co-culture de cellules de Schwann et de neurones provenant d'embryon E17 de rats avec des siARN mais aussi en les injectant dans le nerf sciatique de rat adulte de sorte à induire une extinction spécifique de gènes candidats puis en observant la répercussion sur les protéines myéliniques et le taux d'expression

de ces gènes (EGR2, POU6F1, Sox2, GFAP, GAPDH, TBP, HPRT, Dicer). Nous avons d'abord montré que les siRNA non targeting pouvaient être transfectés efficacement dans les cellules de Schwann et neurones de co-culture mais pouvaient aussi, une fois injecté dans le nerf sciatique de rat adulte, rester à l'intérieur pendant plusieurs jours après l'injection sans entraîner de démyélinisation significative. Nous avons également pu montrer que les siRNA anti-EGR2 pouvaient entraîner une réduction de l'expression d'EGR2 de 50-60% comparé aux siRNA contrôles non targeting et les siRNA anti dicer une réduction de 60-70% par rapport aux contrôles non targeting. L'injection de siRNA anti-Egr2 dans le nerf sciatique de rat adulte a entraîné une démyélinisation rapide et significative caractérisée par la perte de l'expression de P0 dans la zone injectée (par des techniques immunohistochimiques et par observation directe de la démyélinisation au microscope optique sur coupes semi-fines et en coupes ultra-fines au microscope électronique). Contrairement, l'injection de siRNA contrôle non targeting ou de serum physiologique n'entraîne pas de démyélinisation significative. Nous avons aussi étudié l'effet d'une substance chimique (la L- α -lysophosphatidylcholine) sur la gaine de myéline et l'expression de ces facteurs de transcription.

Pour ce faire, nous avons eu une collaboration avec l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Paris pour la mise au point de la technique de co-culture de neurones de ganglions rachidiens postérieurs d'embryons et de cellules de Schwann de nerf sciatique de rat (E15-E17). Nous avons par la suite adopté une technique de culture organotypique (culture de l'ensemble des cellules de ganglions rachidiens postérieurs sans passer par des étapes de purification), ce qui permet de réaliser une myélinisation similaire à celle in vivo puisque l'ensemble des cellules (fibroblastes, cellules de schwann,...) présentes autour du nerf sciatique in vivo est aussi présente dans nos cultures.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

PARTIE I : PHYSIOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE

I. CELLULES ET INTERACTIONS DANS LE SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE

A. La cellule de Schwann

1. Introduction sur la cellule de Schwann

Les deux principaux types cellulaires du nerf périphérique adulte sont les cellules de Schwann myélinisantes qui entourent les axones larges et les cellules de Schwann non myélinisantes qui entourent les petits axones au niveau des invaginations de leurs surfaces. Une des caractéristiques de ces cellules est leur plasticité. Cette propriété de dédifférenciation aussi bien chez les cellules de Schwann myélinisantes que non myélinisantes survient suite à une section du nerf ou à une lésion par écrasement mais il est aussi observé quand les cellules de Schwann se dédifférencient dans des cultures sans neurones. Les cellules de Schwann dédifférenciées ont un phénotype moléculaire qui présente beaucoup de similitudes avec celui des cellules de Schwann immatures au cours du développement. Au cours de la dédifférenciation, les cellules de Schwann myélinisantes régulent négativement les molécules associées à la myéline, expriment de nouveau les molécules d'adhésion cellulaire comme la molécule d'adhésion de la cellule neurale (NCAM) et L1, expriment des facteurs de croissance et des cytokines qui contribuent à la régénération axonale (Jessen et Mirsky, 2005).

Les cellules de Schwann, cellules gliales du système nerveux périphérique sont connues pour leur capacité à produire la gaine de myéline, gaine indispensable à la conduction rapide de l'influx nerveux. Elles enveloppent toutes les fibres nerveuses du système nerveux périphérique depuis leur attache à la moelle épinière et au cerveau jusqu'à leur terminaison. Une cellule de Schwann présente un noyau hétérochromatique habituellement aplati et situé au centre de la cellule, de nombreuses mitochondries, des microtubules et des micro-filaments, souvent plusieurs lysosomes, un réticulum endoplasmique granulaire peu développé et un appareil de golgi petit. Ce sont des partenaires multifonctionnels et indispensables pour les neurones puisqu'elles interviennent dans :

- le développement: les cellules de Schwann participent à la survie des neuroblastes, des neurones et à la pousse des axones en produisant des facteurs neurotrophiques et une matrice extracellulaire.
- le fonctionnement: les cellules de Schwann jouent un rôle prépondérant dans la conduction de l'influx nerveux en isolant électriquement les fibres nerveuses, en provoquant la concentration des canaux ioniques neuronaux au niveau des nœuds de Ranvier et en contrôlant l'environnement ionique des neurones.
- la régénération: une caractéristique majeure des cellules de Schwann est qu'elles permettent la réparation des lésions nerveuses lors de la dégénérescence Wallérienne, en éliminant les débris cellulaires et en stimulant la régénération des fibres nerveuses.

2. Le développement des cellules de Schwann

Les cellules de Schwann myélinisantes et non myélinisantes du nerf moteur adulte dérivent des cellules de la crête neurale (Lobsiger et al., 2002). Les cellules de Schwann des racines postérieures et ventrales et les cellules gliales satellites dans le ganglion proviennent d'autres « pools » cellulaires comme les «boundary cap cells» (Maro et al., 2004). Trois principales transitions développementales sont impliquées. Premièrement, les précurseurs des cellules de Schwann qui occupent les troncs nerveux chez les embryons de 12 – 13 jours chez la souris, sont issus de la migration des cellules de la crête neurale. Ensuite, les précurseurs des cellules de Schwann se transforment en cellules de Schwann immatures qui occupent les nerfs des embryons entre le 15^{ème} et le 16^{ème} jour de la gestation chez le rat. Enfin, autour de la naissance, ces cellules commencent à se transformer premièrement en cellules de Schwann myélinisantes et aussi en cellules de Schwann non myélinisantes trouvées au niveau des nerfs adultes. Tous ces points de transition impliquent un choix de devenir parce qu'in vivo, les cellules de la crête neurale donnent lieu à plusieurs d'autres types cellulaires en dehors de la glie, les précurseurs des cellules de Schwann génèrent des cellules de Schwann immatures et des fibroblastes endoneurales et les cellules de Schwann immatures deviendront soit myélinisantes, soit non-myélinisantes en fonction des axones avec lesquels elles se sont associées (revu dans Jessen et Mirsky, 2005).

Les signaux extracellulaires qui contrôlent ce choix de devenir de la lignée des cellules de Schwann ne sont pas bien connus de même que les mécanismes qui activent les cellules de la crête neurale pour entrer dans la lignée gliale in vivo. Cependant, à travers des expériences in

vivo et in vitro, 3 signaux cellulaires (de cellule à cellule) ont été identifiés jouant le rôle de régulateur du développement des cellules de Schwann. Ce sont la neureguline-1 qui possède des fonctions dans le développement et la myélinisation du nerf, l'endotheline qui est impliquée dans la transition SCP/cellule de Schwann et la signalisation de Notch (Brennan et al., 2000; Garratt et al., 2000b; Wakamatsu et al., 2000; Kubu et al., 2002; Nave et Salzer, 2006). En plus de ces signaux, les molécules de la matrice extracellulaire et leurs récepteurs jouent d'importants rôles dans la prolifération des cellules de Schwann, dans le tri des axones qui a lieu au début de la myélinisation et la myélinisation elle-même (Court et al., 2006; Chen et al., 2007). Ceci inclut des molécules comme LG14 et ADAM 22 (Sagane et al., 2005; Bermingham et al., 2006), des laminines et leurs récepteurs, des intégrines $\beta 1$, des dystroglycanes et de petits GTPases (Chen et Strickland, 2003; Court et al., 2006; Benninger et al., 2007; Nodari et al., 2007). Deux facteurs de transcription sont indispensables pour le développement des cellules de Schwann. Le premier, Sox10 est essentiel pour la genèse des «earliest cells» dans la lignée des cellules de Schwann, il est aussi impliqué dans la myélinisation (Britsch et al., 2001; Schreiner et al., 2007) tandis que le second Krox20, est essentiel pour la myélinisation (Topilko et al., 1994; Topilko et Meijer, 2001).

Chez des souris présentant une invalidation de Krox20, les cellules de Schwann adoptent une relation 1 : 1 avec les axones mais ne peuvent pas procéder à la myélinisation, ce phénomène est révélateur de l'importance de ce facteur dans la régulation du programme de myélinisation (Topilko et al., 1994). Il est aussi impliqué dans la maintenance à long terme de la myéline car une excision induite par le tamoxifène entraîne dans des nerfs une démyélinisation et une dédifférenciation (Decker et al., 2006). Par ailleurs, une transfection de Krox20 dans des cultures de cellules de Schwann dédifférenciées de souris ou de rats provenant de nouveaux nés permet d'induire une gamme de gènes et de protéines de myéline (Nagarajan et al., 2001; Parkinson et al., 2004). Il inactive aussi la réponse proliférative des cellules de Schwann en culture induite par la neureguline1 et la réponse apoptotique de TGF β qui sont tous les deux caractéristiques du phénotype des cellules de Schwann immatures (Zorick et al., 1999; Parkinson et al., 2001; 2004). D'autres facteurs de transcription tels que Oct6 et dans une moindre mesure, Brn-2 sont requis pour un «timing» correct de la myélinisation bien que les études in vitro suggèrent que le facteur de transcription NF κ B est impliqué dans le contrôle de l'expression d'Oct-6 et est par conséquent susceptible d'être impliqué dans le «timing» de la myélinisation (Topilko et Meier, 2001; Jaegle et al., 2003; Nickols et al., 2003). In vivo, les précurseurs des cellules de Schwann et les cellules de Schwann immatures prolifèrent

rapidement avec un pic d'incorporation d'ADN au stade de cellules de Schwann immatures (Stewart et al., 1993; Yu et al., 1995).

La division cellulaire est compatible avec le processus de différenciation qui transforme le phénotype des cellules de la crête neurale, premièrement à celui des précurseurs des cellules de Schwann et ensuite à celui des cellules de Schwann immatures. Ce n'est qu'à la sortie du cycle cellulaire qu'a lieu la transition finale qui assure le passage des cellules de Schwann immatures aux cellules de Schwann myélinisantes et non myélinisantes. Une caractéristique remarquable de la lignée des cellules de Schwann est la réversibilité rapide de cette dernière étape de développement. La suppression du contact des cellules de Schwann avec les axones initie l'inversion qui peut être réalisée soit par lésion du nerf *in vivo* ou en mettant en culture des cellules de Schwann de nerf sans neurones. Aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, le processus implique la régression du développement, la dédifférenciation des cellules de Schwann individuelles et une détérioration de la myéline. *In vivo*, les cellules de Schwann commencent à digérer leur propre myéline et dans les stades ultérieurs du processus, ce phénomène est soutenu par les macrophages (Hirata et Kawabuchi, 2002). Par cette voie, les inhibiteurs associés à la myéline, à la régénération de l'axone seraient supprimés. Ne possédant plus les caractéristiques moléculaires et structurales des cellules de Schwann myélinisantes ou non myélinisantes, ces cellules commencent à proliférer, expriment de nouveau les marqueurs des cellules de Schwann immatures et aussi les molécules stimulant la croissance axonale comme L1 et NCAM. Elles régulent aussi positivement l'expression de facteurs trophiques, de cytokines comprenant le NGF, le BDNF, le GDNF, la LIF, la MCP et des molécules de la matrice extracellulaire incluant la laminine-2 et 8 (Chen et al., 2007). Le phénotype de ces cellules de Schwann dénervées est très proche de celui des cellules de Schwann immatures avant la myélinisation, elles forment un substrat favorable pour la repousse des axones. Suite à une réassociation avec des axones, ces cellules se redifférencient et myélinisent facilement au cours de la régénération du nerf (Fawcett et Keynes, 1990; Scherer et Salzer, 2001). Le processus de dédifférenciation dépend de l'activation de voies de signalisation particulières et de facteurs de transcription. Ces signaux, qui s'opposent aux régulateurs positifs de la myélinisation comprenant l'activation de Krox20, de cAMP et les signaux axonaux de la myélinisation comme la neureguline-1 peuvent être collectivement appelés régulateurs négatifs de la myélinisation. L'identification de régulateurs négatifs de la myélinisation c'est-à-dire les voies de signalisation spécifique et de facteurs de transcription qui inhibent ou inversent la myélinisation rend possible la visualisation de l'état de la myélinisation des cellules de Schwann tel que déterminé par la balance entre les systèmes de signalisation opposés. D'autres transitions dans la lignée peuvent aussi être

réversibles. Bien que l'inversion du phénotype des cellules de Schwann immatures entraînant une reconstitution des précurseurs des cellules de Schwann n'ait pas été observée, l'analogie avec d'autres tissus suggère qu'il pourrait bien être possible. Les précurseurs des cellules de Schwann ont un phénotype cytoarchitectural unique, des molécules associées aux cellules gliales spécifiques qui les différencient sans ambiguïté à partir des cellules de la crête neurale et d'autres cellules dérivées de la crête (Jessen et Mirsky, 2005 ; Wanner et al., 2006a). Dans leur signalisation normale dans le développement des troncs nerveux, bien que la majorité devient des cellules de Schwann, une minorité devient des fibroblastes endoneuraux mais en culture, elles peuvent aussi générer des neurones et des cellules de muscles lisses (Morrison et al., 1999 ; Joseph et al., 2004). Il est aussi possible que même si la plupart des cellules rentrent dans l'étape de développement suivante à chacune des trois principales transitions, une population résiduelle peut conserver les caractéristiques du stade plus précoce. En plus des précurseurs des cellules de Schwann, les nerfs d'embryons E14 de rat hébergent une population différente de cellules (10-15% du nombre total des cellules) qui ressemblent aux cellules de la crête neurale bien que ces cellules soient plus décalées vers la lignée gliale que les cellules migrantes de la crête neurale (Morrison et al., 1999 ; 2000). Il est aussi possible que des « SCP-like cells » soient aussi présents dans les nerfs périnataux (Bixby et al., 2002) et même les nerfs adultes peuvent contenir des cellules avec un phénotype précoce correspondant aux précurseurs de cellules de Schwann (Rizvi et al., 2002). Beaucoup d'autres tissus incluant le système nerveux central, le système nerveux entérique, le système musculaire et hématopoïétique regorgent des populations cellulaires avec un potentiel de développement réminiscent au début du développement dans leur lignée respective.

3. Les différentes étapes de développement des cellules de Schwann : Analyse de la lignée schwannienne

L'utilisation d'un ensemble de marqueurs bien défini a grandement facilité l'analyse des étapes de développement des cellules de Schwann. La transition de la crête neurale à l'étape de précurseurs de cellules de Schwann est marquée par l'apparition des acides gras du cerveau couplés à des protéines (comme la BFABP chez la souris), d'ARNm de P0, de la connexine 29 et de la cadhérine 19 (Jessen et Mirsky, 2005 ; Li et al., 2007). La cadhérine est régulée négativement, il est le seul marqueur caractéristique qui est limité aux précurseurs des cellules de Schwann, au moins in vivo (Takahashi et Osumi, 2005).

Les cellules de Schwann immatures expriment S100 β , GFAP et l'antigène glycolipidique 04, des molécules qui ne sont pas exprimées ou exprimées à des niveaux très bas par les précurseurs des cellules de Schwann. A la transition entre les précurseurs des cellules de Schwann et les cellules de Schwann, le facteur de transcription AP2 α et la cad19 sont régulés négativement (Jessen et Mirsky, 2005). Au début de la myélinisation, les molécules associées à la myéline incluant Krox-20, la MAG, la periaxin, la P0, la MBP, la PMP22, et la galactocérébroside sont fortement régulées positivement. La myélinisation est accompagnée par une vaste régulation négative d'un ensemble de molécules qui caractérise le stade immature tel que la L1, la NCAM et le récepteur p75 de la neurotrophine. La plupart d'entre elles reste exprimée par les cellules de Schwann matures non myélinisantes. De plus, ces cellules expriment au moins deux molécules, l'intégrin $\alpha 1\beta 1$ et la galactocérébroside qui ne sont pas exprimées par les cellules de Schwann immatures (Jessen et Mirsky, 2005). L'inversion du phénotype moléculaire des cellules myélinisantes à un phénotype similaire à celui des cellules de Schwann immatures est observée après une lésion du nerf ou quand les cellules myélinisantes sont dissociées des axones qu'elles enveloppaient. Aussi, une différence significative a été montrée dans l'expression des ARNm entre le stade myélinisant et le stade immature mais à présent, peu de ces études ont été définitivement validées comme marqueurs de transition dans la lignée (Araki et al., 2001 ; Nagarajan et al., 2001 ; 2002 ; Bermingham et al., 2002 ; Verheijen et al., 2003 ; Buchstaller et al., 2004 ; Le et al., 2005a ; 2005b ; Bosse et al., 2006 ; D'Antonio et al., 2006a).

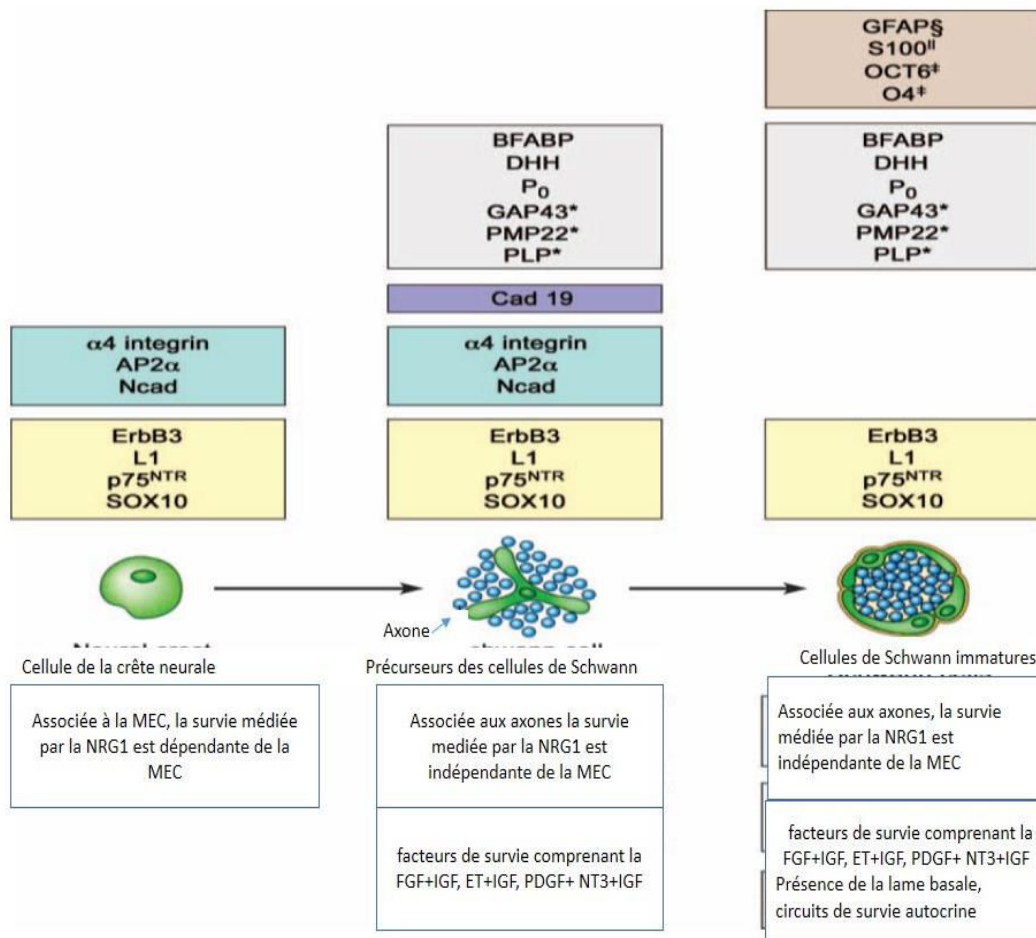


Figure 1: Les phénotypes caractéristiques de chacune des étapes clés du développement embryonnaire. Les cases au dessus montrent le profil moléculaire de chaque étape. Les cases jaunes montrent les molécules exprimées par tous les trois types cellulaires tandis que les autres cases montrent des molécules restreintes à certains stades. GAP43, PMP22, PLP sont des protéines qui apparaissent aussi sur les neuroblastes/neurones précoces. O4 et Oct6 sont des marqueurs dépendant des axones pour leur expression. GFAP est le marqueur tardif dans la genèse des cellules de Schwann parce qu'une expression significative n'est pas observée autour de la naissance. S100, les précurseurs des cellules de Schwann sont négatifs à S100 et les cellules de Schwann sont positives à S100. En utilisant les techniques immunohistochimiques, des niveaux bas de S100 ont été cependant détectés dans plusieurs précurseurs de cellules de Schwann de souris quand la sensibilité de la technique est augmentée. La Cad19 est exclusivement exprimée par les SCPs. Chaque stade de développement implique des relations

caractéristiques avec les tissus voisins et des propriétés distinctes de la signalisation cellulaire. Par exemple, les cellules de la crête neurale s'associent à la matrice extracellulaire et migrent à travers cette dernière. Au contraire, les précurseurs des cellules de Schwann et les cellules de Schwann sont intégrés aux neurones (axones) avec un espace minimal extracellulaire les séparant de la membrane de la cellule nerveuse, une caractéristique des cellules gliales dans le système nerveux périphérique et central. La lame basale est absente des cellules migrantes de la crête neurale et des SCPs mais apparaît sur les cellules de Schwann. In vitro, la neureguline 1 soutient la survie des précurseurs des cellules de Schwann et des cellules de Schwann, de même que des facteurs tels que le FGF, l'IGF, l'endotheline, le PDGF et la neurotrophine 3. Les cellules de Schwann ont aussi des circuits de survie autocrine qui sont absents des précurseurs des cellules de Schwann. (d'après Jessen et Mirsky, 2005).

a. Les cellules de la crête neurale et les précurseurs des cellules de Schwann

Les précurseurs des cellules de Schwann définissent le premier stade de différenciation de la glie dans les troncs nerveux périphériques (Jessen et al., 1994 ; Dong et al., 1995 ; 1999 ; Jessen et Mirsky, 2005 ; 2007). La plupart ou toutes les cellules des nerfs des membres des embryons de rat E14/E15 (E12/E13 pour la souris) sont des précurseurs des cellules de Schwann bien qu'il soit possible qu'un petit nombre de cellules dérivées de la crête neurale subsiste dans ces nerfs. Les cellules de la périphérie de la capsule trouvées dans les racines ventrales et dorsales à ce stade sont distinctes des précurseurs des cellules de Schwann. In vivo, les cellules de la périphérie de la capsule donnent naissance à presque toutes les cellules de Schwann des racines dorsales et génèrent aussi une petite population de neurones sensitifs (Maro et al., 2004). Contrairement aux cellules de Schwann, ils expriment transitoirement Krox20 au stade précoce du développement (autour de E10) et ont des fonctions importantes dans le maintien du système nerveux central et périphérique (Maro et al., 2004 ; Bron et al., 2007). Les précurseurs des cellules de Schwann sont insérés en apposition aux axones, une caractéristique universelle des cellules gliales du système nerveux central et périphérique. Contrairement aux nerfs plus âgés où il y a des tissus de conjonction fibreux contenant des vaisseaux sanguins entourant les unités formées par les axones et les cellules de Schwann, les nerfs de rats E14 ou souris E12 sont compacts et ne possèdent pas significativement de tissus de conjonction ou de vaisseaux. Les axones aussi bien que les précurseurs des cellules de Schwann sont fortement positifs à la N-cadhérine à ce stade. In vivo, dans les nerfs sciatiques de rat, comme les cellules de Schwann immatures sont générées, la N-cadhérine est régulée négativement bien qu'en culture, la N-cadhérine soit aussi exprimée par les cellules de Schwann en réponse à une signalisation de

neureguline (Wanner et al., 2006a ; 2006b). Dans des nerfs E14 et E15, la plupart des cellules ont le phénotype de précurseurs de cellules de Schwann, tandis qu'à E18, la plupart de celles-ci ont des propriétés de cellules de Schwann immatures. Dans ces nerfs, la transition entre les précurseurs des cellules de Schwann et les cellules de Schwann est centrée au 16^{ème} jour du stade embryonnaire. Chez les souris, la conversion correspondante a lieu deux jours avant (Dong et al., 1999 ; Wanner et al., 2006b). A E14, les précurseurs de cellules de Schwann de rat expriment un niveau très bas de S100 cytoplasmique comparable aux cellules de Schwann immatures trouvées dans le nerf à E18. Par ailleurs, les cellules de Schwann E18 et des nerfs plus âgés dissociés d'axones et mises en culture survivent sans ajout de facteurs alors que les précurseurs des cellules de Schwann à E14 meurent rapidement sans ajout de facteurs de survie quelle que soit la densité cellulaire. Cette différence de régulation de survie est due à la présence de circuits de survie autocrines dans les cellules de Schwann qui ne sont pas présents au niveau des précurseurs des cellules de Schwann. La survie des précurseurs des cellules de Schwann dépend de la signalisation par les axones de la juxtacrine neureguline1 type III (Dong et al., 1995 ; Meier et al., 1999 ; Jessen et Mirsky, 2005). La fonction essentielle des précurseurs des cellules de Schwann est la genèse des cellules de Schwann mais un rôle additionnel important est montré par l'étude de mutants de souris qui ne possèdent pas respectivement de neureguline1 type III, des récepteurs des neuregulines ErbB3 ou ErbB2 ou le facteur de transcription Sox10. Chez certains des souris avec une inactivation du facteur de transcription Sox10, toute la glie périphérique perd sa capacité à se développer, et chez d'autres mutants, les précurseurs des cellules de Schwann sont soit absentes ou leur nombre est fortement réduit, un phénomène dû à leur dépendance de la neureguline 1 pour leur survie. Dans les neuregulines et les récepteurs des neuregulines des mutants, les neurones des ganglions rachidiens postérieurs et les neurones moteurs sont initialement générés normalement mais à E14 et E18, au niveau des membres, la majorité de ces cellules meurent. Cette mort cellulaire est probablement due à l'absence de signaux dérivés de la glie dont les neurones moteurs et sensitifs ont besoin pour leur survie. Il y a aussi la possibilité que la signalisation reverse provenant du domaine extracellulaire de neureguline-1 puisse contribuer à la survie neuronale (Riethmacher et al., 1997 ; Britsch et al., 2001 ; Nave et Salzer, 2006). Ainsi, une fonction clé des précurseurs des cellules de Schwann et des cellules de Schwann immatures serait de réguler le « pool » des neurones embryonnaires du système nerveux central et périphérique. La perte du contact axonal avec des cibles périphériques peut aussi contribuer fortement à la mort des neurones sensitifs et moteurs (Wolpowitz et al., 2000). L'activation de Notch serait impliquée dans la promotion du développement de la glie périphérique (Morrison et al., 2000 ; Wakamatsu et al., 2000 ; Kubu

et al., 2002). Elle favorise le développement des cellules gliales du système nerveux central, les astrocytes et les cellules de Müller in vivo (Furukawa et al., 2000 ; Gaiano et al., 2000 ; Tanigaki et al., 2001 ; Ge et al., 2002).

Notch stimule la formation des cellules progénitrices des oligodendrocytes tout en inhibant leur progression aux cellules de Schwann myélinisantes (Wang et al., 1998 ; Popko, 2003). Dans le système nerveux périphérique, Notch accélère la formation des cellules de Schwann et favorise la restriction des cellules gliales précoces à la lignée des cellules de Schwann. Les cellules des nerfs embryonnaires sont beaucoup plus sensibles à l'activation de Notch. Le rôle majeur de Notch dans le développement du nerf embryonnaire est de favoriser la genèse des cellules de Schwann à partir des précurseurs des cellules de Schwann.

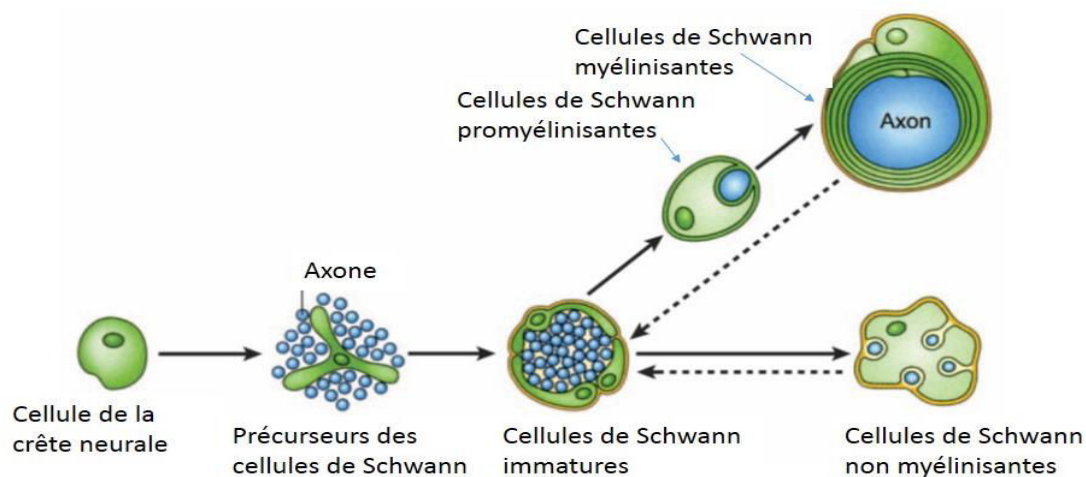


Figure 2: La lignée des cellules de Schwann. Illustration schématique des principaux types cellulaires et les transitions dans le développement des cellules de Schwann. Les flèches en pointillé indiquent la réversibilité et chez la plupart des rongeurs à l'âge post-natal, la transition qui génère les cellules matures myélinisantes et non-myélinisantes. La phase embryonnaire du développement des cellules de Schwann impliquent trois populations transitoires de cellules. Premièrement, les cellules migrantes de la crête neurale. Deuxièmement, les précurseurs des cellules de Schwann. Ces cellules expriment un certain nombre de marqueurs de différenciation tels que la BFABP, la P0, la « desert hedgehog (DDH) » et d'autres que l'on ne trouve pas chez

les cellules migrantes de la crête neurale. Troisièmement, les cellules de Schwann immatures. Toutes ces cellules sont considérées comme ayant le même potentiel de développement et leur devenir est issu des axones avec lesquels elles s'associent. Seules les cellules de Schwann qui enveloppent les axones de grand diamètre deviendront des cellules myélinisantes pendant que celles qui s'associent avec des axones de petits diamètres évoluent en cellules de Schwann matures non myélinisantes. (d'après Jessen et Mirsky, 2005 ; Mirsky et al., 2008).

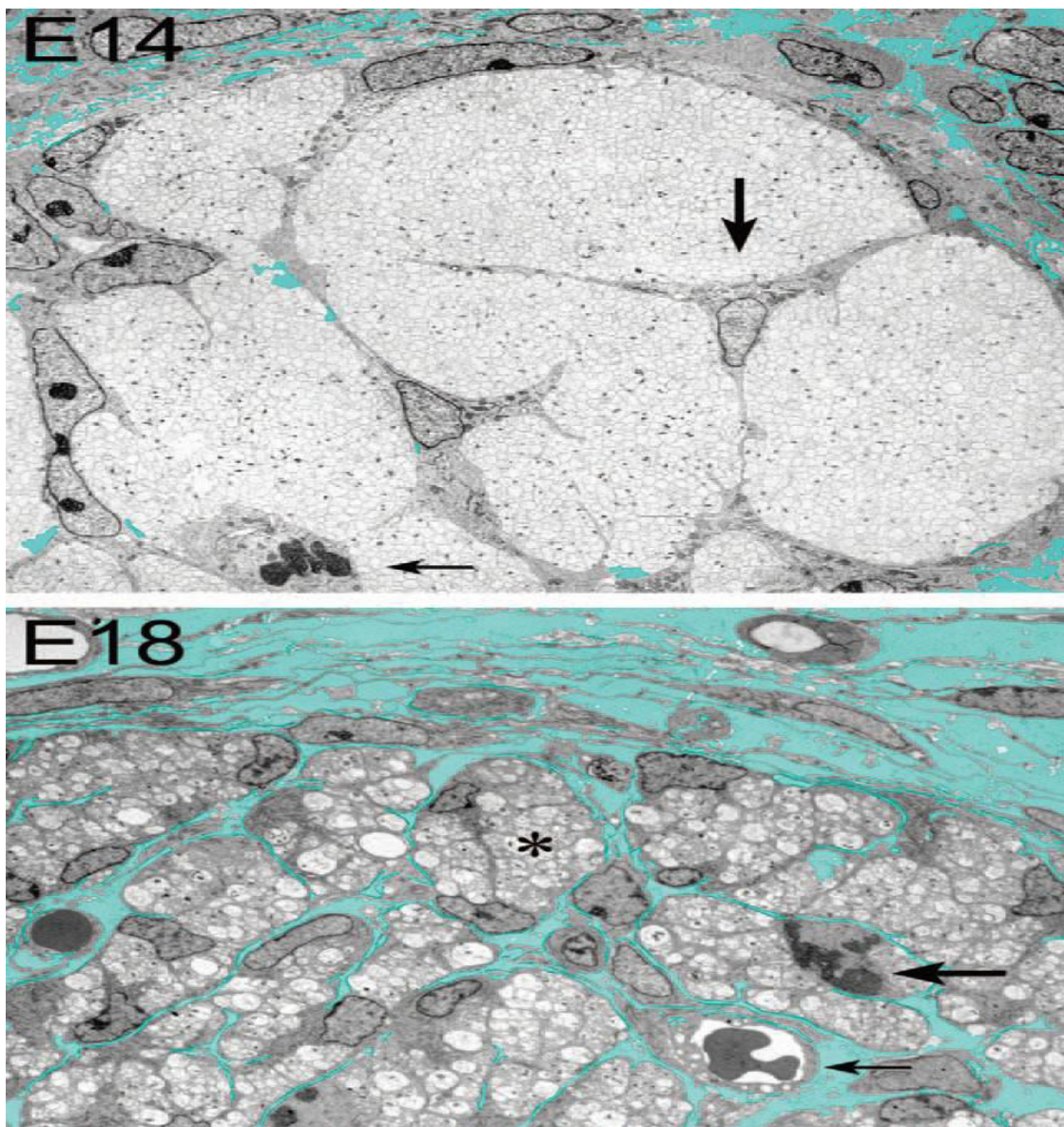


Figure 3: La présentation des SCP et des cellules de Schwann immatures. Le schéma d'en haut montre (en microscopie électronique) une coupe transversale d'un nerf dans le membre postérieur d'embryon de rat E14. Une branche des précurseurs des cellules de Schwann parmi les axones à l'intérieur du nerf (la flèche verticale) et sont aussi présents en apposition à la proximité des axones à la surface du nerf. Un précurseur de cellule de Schwann en cours de mitose (la flèche horizontale). L'espace extracellulaire du tissu conjonctif contenant les cellules

mésenchymateuses entoure le nerf mais est essentiellement absent à l'intérieur du nerf lui-même (montré en turquoise). Ces nerfs sont dépourvus de vaisseaux sanguins et les axones ont des diamètres plus petits et plus uniformes que ceux observés dans les nerfs matures (x2000). Le schéma d'en bas montre des cellules de Schwann immatures d'une coupe transversale de nerf sciatique d'embryon de rat d'E18 présenté au même grossissement. En contraste marqué avec le nerf E14, les espaces du tissu conjonctif bifurquent à travers le nerf parmi les faisceaux compacts des cellules de Schwann immatures et les axones associés (Schwann cell families ; Webster et Favilla, 1984, montrés ici par l'astérisque). Les vaisseaux sanguins (montrés par la flèche horizontale d'en bas) et des fibroblastes (directement au dessus des vaisseaux) apparaissent aussi à l'intérieur du nerf. Une cellule de Schwann en mitose (la flèche horizontale d'en haut). A l'extérieur du nerf (dans la partie supérieure de l'image), le tissu conjonctif contenant des fibroblastes aplatis au début. Schéma simplifié des principaux stades de maturation des cellules de Schwann (d'après Jessen et Mirsky, 2005).

b. Molécules clés des cellules de Schwann immatures, myélinisantes et non myélinisantes et maladies associées au dysfonctionnement de chacune d'elle

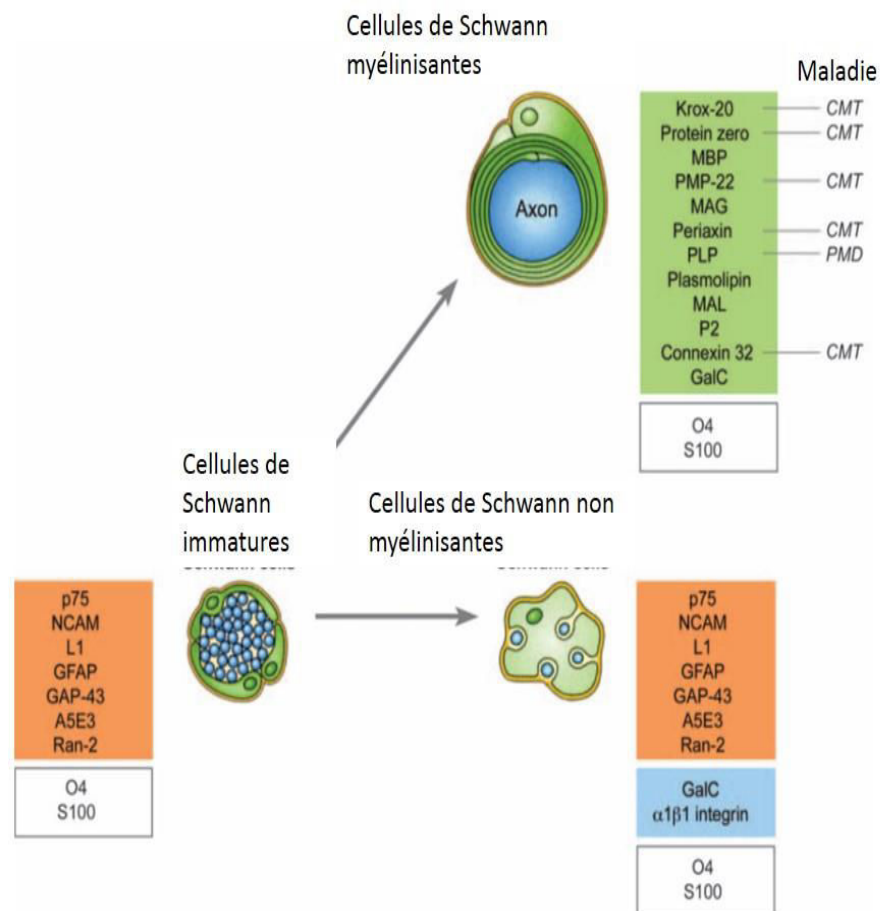


Figure 4: Changement de l'expression moléculaire quand les cellules de Schwann commencent à former des cellules myélinisantes et non myélinisantes. La myélinisation implique la combinaison des régulations positives et négatives des molécules clés. Le groupe en vert montre les marqueurs des cellules de Schwann myélinisantes. Ces molécules sont fortement régulées positivement pendant la myélinisation. Le groupe orange montre les marqueurs des cellules de Schwann immatures. Ils sont régulés négativement au cours de la myélinisation mais restent exprimées par les cellules de Schwann matures non myélinisantes. Le groupe bleu montre les marqueurs des cellules de Schwann matures non myélinisantes qui ne sont pas trouvés chez les cellules de Schwann immatures. La galactocérobroside est exprimée par les cellules de Schwann myélinisantes et non myélinisantes alors que l'intégrine $\alpha1\beta1$ est régulée

positivement, spécifiquement par les cellules non myélinisantes quand elles deviennent matures (Jessen et Mirsky, 2003). La genèse des cellules matures non myélinisantes des cellules immatures implique peu de changements moléculaires. Le groupe blanc montre les antigènes 04 et S100 qui sont exprimés par les cellules de Schwann dans les nerfs périphériques, l'antigène 04 est régulé négativement en absence d'axones (Jessen et Mirsky, 2005). Des neuropathies démyélinisantes héréditaires résultent de l'expression anormale de certaines protéines myéliniques indiquées. Les cellules de Schwann dérivent toutes des cellules souches multipotentes de la crête neurale, (également génératrices des neurones et des mélanocytes). A partir de ces dernières naissent des précurseurs de cellules de Schwann qui migrent le long des neurites et dont la principale particularité est de dépendre des neurones pour leur survie. Ces précurseurs se différencient ensuite en cellules de Schwann embryonnaires. Cette étape de maturation est caractérisée par l'induction de l'expression de la protéine S100, protéine spécifique des cellules de Schwann dans les nerfs périphériques. Ensuite, les cellules de Schwann s'engagent dans deux voies de différenciation en fonction du type d'axone avec lequel elles se sont associées. Les axones de diamètre supérieur à 0,8-1 μm dirigent les cellules de Schwann embryonnaires vers le phénotype myélinisant en passant par un stade intermédiaire de maturation, celui des cellules de Schwann prémyélinisantes. Si l'axone a un calibre plus faible que 0,8 μm , alors les cellules de Schwann deviennent des cellules de Schwann « non myélinisantes » dont les extensions cytoplasmiques entourent plusieurs axones de manière individuelle (les axones sont isolés les uns des autres). Contrairement aux précurseurs schwanniens, les cellules de Schwann différenciées ne dépendent plus de signaux axoniques pour survivre (d'après Mirsky et al., 2008).

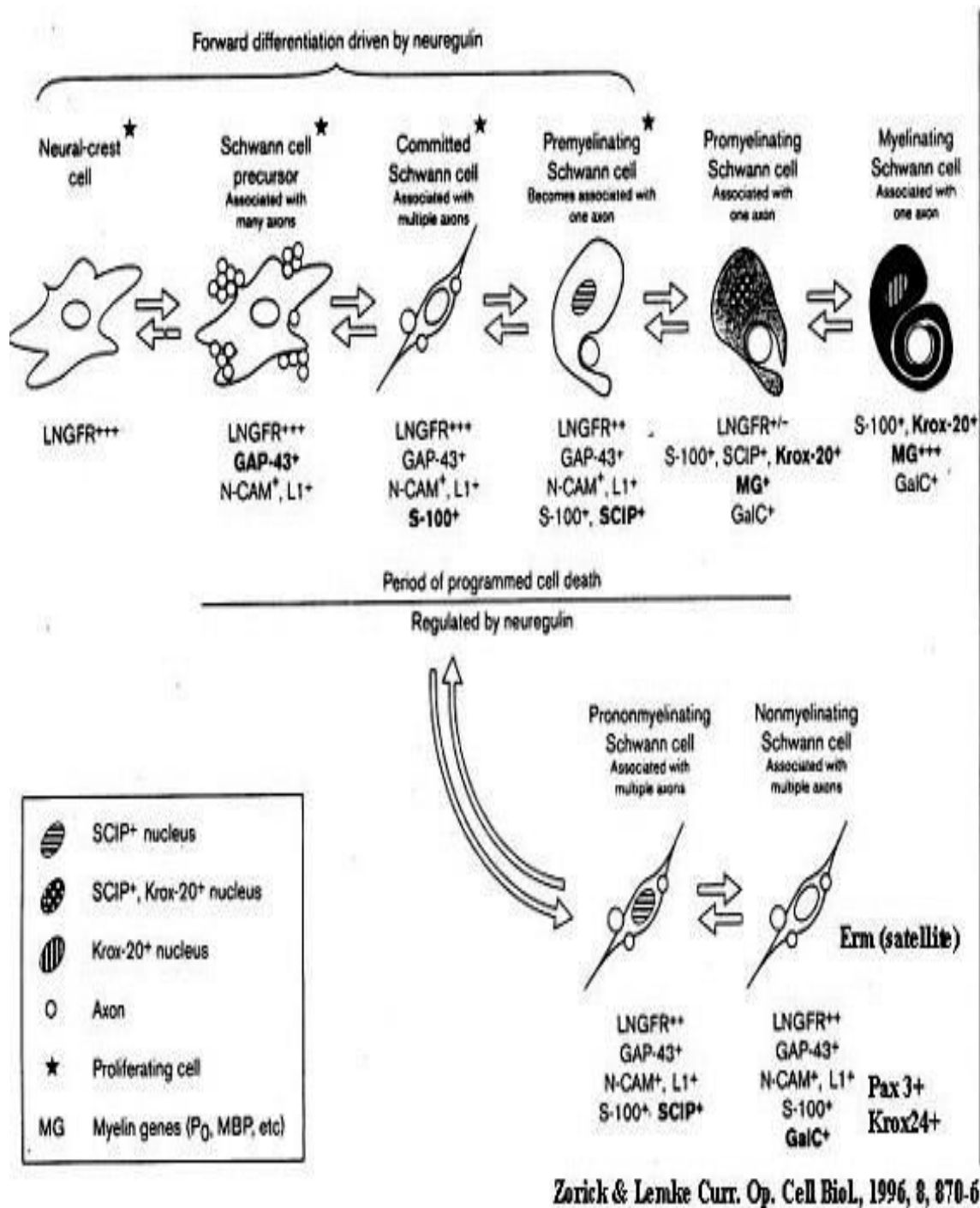


Figure 5. Schéma détaillé des différentes étapes de différenciation des cellules de Schwann en cellules myélinisantes ou non myélinisantes. Les divers stades de développement sont caractérisés par l'expression de protéines spécifiques. Les flèches en double sens signifient que la différenciation est réversible : le maintien de l'état différencié est lié à des interactions complexes avec les neurites. La perte du contact neuronal entraîne la dédifférenciation des cellules de Schwann.

Les cellules myélinisantes synthétisent la caveolin-1, la périaxine, les protéines de la myéline : P0, MBP, MAG, PMP22 et des facteurs de transcription tels que Krox20 et Brn5. Les cellules de Schwann non myélinisantes expriment par exemple le récepteur à faible affinité des neurotrophines p75, les protéines d'adhésion NCAM et L1, la GAP43, la GFAP, et les facteurs de transcription Krox24, Pax3 et c-Jun. La différenciation des cellules de Schwann est stabilisée par leurs contacts avec les neurones. Si celui-ci est rompu, les cellules de Schwann se dédifférencient et retournent dans le cycle prolifératif.

Il existe différents types de cellules de Schwann, au delà de la dichotomie phénotypique myélinisante/ non myélinisante, les cellules de Schwann se répartissent en plusieurs familles : les cellules terminales de la jonction neuromusculaire, la glie entérique des intestins, les cellules satellites ganglionnaires associées aux somas des neurones et la glie entourant les fibres nerveuses simplement appelée cellules de Schwann. Parmi toutes ces cellules non neuronales, peu d'entre elles sont capables de produire de la myéline. Celles-ci se trouvent principalement dans les nerfs et exceptionnellement dans les ganglions comme le ganglion rachidien postérieur. Toutes les autres cellules de Schwann partagent plus ou moins des caractéristiques du phénotype moins différencié des cellules de Schwann non myélinisantes.

4. La lame basale des cellules de Schwann

Chaque cellule de Schwann dans l'endonevire est entourée par une lame basale. Pour les cellules de Schwann formant la myéline (cellules de Schwann myélinisantes), la lame basale forme un tube continu autour des internoeuds des axones myélinisés. Cette lame basale continue peut potentiellement coordonner la distribution des molécules qui sont trouvées entre les internoeuds (comme l'E-cadhérine) au cours du développement et est importante pour diriger la régénération de l'axone (revue dans Stoll et Muller, 1999). Les études du groupe de Mary et Richard Bunge ont montré que la lame basale est importante pour la myélinisation. Ils ont aussi établi une analogie entre l'épithélium et les cellules de Schwann parce que ces dernières sont requises pour polariser la surface face à la lame basale et celle face à l'axone (Bunge et Bunge, 1983). L'assemblage de la lame basale (pas sa maintenance) dépend de la présence des axones (Bunge et al., 1982 ; Clark et Bunge, 1989). Une myélinisation partielle dans un système de co-culture pourrait être atteint en absence de sérum et d'acide ascorbique aussi longtemps que dans un milieu contenant du B27 et d'antioxydant (Podratz et al., 1998 ; 2004). Dans ce système, la myéline est formée en absence de la lame basale mais la lame basale est déjà présente autour des cellules de Schwann (Podratz et al., 2001). Ces résultats, de concert avec l'observation que

la myéline peut être trouvée in vivo en absence d'une lame basale continue (Madrid et al., 1975 ; Nakagawa et al., 2001) indiquent que le processus d'assemblage d'une lame basale continue n'est pas en soit nécessaire pour la myélinisation.

5. La régulation de la fonction des cellules de Schwann par les laminines et les récepteurs des laminines

a. Les laminines dans le système nerveux périphérique

Les laminines sont des protéines hétérotrimériques, ce sont des composants essentiels de la matrice extracellulaire. De nos jours, 5 chaînes α , quatre chaînes β et trois chaînes γ ont été identifiés et 15 isoformes ont été observés (Colognato et Yurchenco, 2000 ; Grimpe et al., 2002 ; Yin et al., 2003). Chez les mammifères, les laminines jouent trois rôles qui se chevauchent (Miner et Yurchenco, 2004) : (1) ils déterminent la structure de la membrane basale (Tabernero et al., 1998 ; Timpl, 1996 ; Yurchenco et al., 2004), (2) ils fournissent des sites d'attachement via les protéines de surface (Henry et Campbell, 1996), (3) ils jouent le rôle de ligand pour les récepteurs des cellules initiant le signal qui influence le comportement et la survie cellulaire (Schwartz, 2001). Les laminines sont présents dans plusieurs tissus neuraux incluant le système nerveux central (Grimpe et al., 2002; Hagg et al., 1989, Indyk et al., 2003), la jonction neuromusculaire (Noakes et al., 1995; Patton et al., 1997, 1998, 2001; Sanes et Lichtman, 2001) et les nerfs périphériques (Doyu et al., 1993). La laminine 2 ($\alpha 2$, $\beta 1$, $\gamma 1$); la laminine 8 ($\alpha 4$, $\beta 1$, $\gamma 1$) et la laminine 10 ($\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 1$) sont exprimés dans le système nerveux périphérique (Feltri et Wrabetz, 2005) et jouent un rôle essentiel dans la myélinisation des axones par les cellules de Schwann [revue dans (Yu et al., 2007)]. Des études utilisant des co-cultures de cellules de Schwann/neurones ont montré qu'un dépôt de laminines est requis pour la myélinisation in vitro (Fernandez-Valle et al., 1993,1994 ; Podratz et al., 2001). Une mutation de laminine $\alpha 2$ est à l'origine de neuropathie périphérique aussi bien chez l'homme (Helbling-Leclerc et al., 1995) que chez la souris (Shorer et al., 1995 ; Sunada et al., 1995 ; Xu et al., 1994). Les souris mutantes pour la laminine $\alpha 2$ aussi appelées souris dystrophiques ont des axones hypomyélinisés dans lesquels les faisceaux d'axone nus ne sont pas myélinisés surtout dans la région proximale du nerf périphérique (Bradley et Jenkinson, 1973 ; Stirling, 1975). La lame basale de l'endonevire est perturbée et la vitesse de conduction nerveuse est réduite dans les nerfs de ces souris (Rasminsky et al., 1978). Dans les nerfs des souris mutantes pour la laminine $\alpha 2$, la laminine

$\alpha 4$ et $\alpha 1$ sont régulés positivement dans l'endonèvre (Patton et al., 1997 ; Previtali et al., 2003). Les cellules de Schwann de souris dépourvues de la sous-unité $\gamma 1$ de la laminine perdent l'expression de toutes les laminines et les souris portant cette mutation présentent un phénotype sévère (Yu et al., 2005, 2007). Ces souris ont des tremblements, une faiblesse musculaire et une paralysie des membres postérieurs empêchant la plupart d'entre elles d'atteindre l'âge adulte. Les nerfs périphériques de ces mutants sont plus petits que les contrôles et la vitesse de conduction nerveuse est considérablement diminuée. Au microscope électronique, les fibres nerveuses sont grandement hypomyélinisées et la plupart des axones sont nus et bien compactés. Leurs cellules de Schwann ne s'étendent pas entre les prolongements des axones, et elles n'ont pas une lame basale continue (Chen et Strickland, 2003 ; Yu et al., 2005). La prolifération de ces cellules de Schwann mutantes est très affectée entraînant une baisse considérable du nombre de cellules de Schwann (Yu et al., 2005).

Au cours du développement du nerf périphérique, les précurseurs des cellules de Schwann se différencient pour devenir des cellules de Schwann immatures. Quand les cellules de Schwann immatures entrent dans la lignée myélinisante, elles prolifèrent et commencent à se différencier en cellules promyélinisantes. Les cellules individuelles étendent leurs prolongements dans les faisceaux des axones et établissent une relation 1 :1 avec chaque axone de diamètre large. Ce processus est appelé tri radial (Martin et Webster, 1973 ; Webster et al., 1973). Par conséquent, les souris mutantes pour la laminine peuvent être classées comme ayant une détérioration sévère du tri radial axonal. Les cellules de Schwann provenant de ces souris mutantes pour la laminine $\gamma 1$ perdent la capacité à réguler négativement Oct-6 et régulent positivement Krox20, 2 facteurs de transcription essentiels pour la différenciation des cellules de Schwann. En période postnatale, les cellules de Schwann avec inhibition de la laminine $\gamma 1$ présentent une apoptose accrue (Yu et al., 2005).

Les souris mutantes pour la laminine $\alpha 4$ présentent un phénotype d'hypomyélinisation dans leurs nerfs périphériques (Yang et al., 2005). Cependant, contrairement aux mutants $\alpha 2$ qui montrent une plus sévère hypomyélinisation dans les racines comparativement à la partie distale des nerfs périphériques, la racine des mutants $\alpha 4$ est assez normale et est moins affectée que le nerf distal. En plus, les mutants pour la laminine $\alpha 4$ contiennent de multiples axones qui sont enveloppés par une gaine de myéline et forment des faisceaux polyaxonaux myélinisés, un phénomène rarement observé chez des souris mutantes pour la laminine $\alpha 2$ ou $\gamma 1$ (Yang et al., 2005). Ces différences peuvent être dues à une compensation à partir d'isoforme de différents laminines. Les nerfs distaux sont également hypomyélinisés chez des souris doubles mutants $\alpha 2/\alpha 4$ (Yang et al., 2005). Ces observations suggèrent que les différents isoformes des laminines

peuvent jouer des rôles distincts dans différentes parties du système nerveux périphérique au cours du développement.

b. Les récepteurs des laminines dans le système nerveux périphérique

Les cellules de Schwann expriment plusieurs récepteurs potentiels de laminines comprenant les intégrines $\alpha 6\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ (Previtali et al., 2003). Les effets de signalisation des laminines au cours de la myélinisation seraient médiés principalement par le biais de l'intégrine $\beta 1$. Des études *in vivo* et sur des cultures cellulaires ont montré que l'interférence avec la fonction de l'intégrine $\beta 1$ entraîne une inhibition de la myélinisation (Fernandez-Valle et al., 1994 ; Feltri et al., 2002 ; Podratz et al., 2001 ; Relvas et al., 2001). Des perturbations spécifiques de l'intégrine $\beta 1$ dans des cellules de Schwann entraînent une neuropathie périphérique démyélinisante similaire aux souris mutantes pour la laminine (Feltri et al., 2002) indiquant que cette fonction des laminines dans le tri des axones est principalement médiée par l'intégrine $\beta 1$. Cependant, bien que la perturbation des laminines dans les cellules de Schwann entraîne une baisse de la prolifération et une augmentation de la mort cellulaire, la perturbation de l'intégrine $\beta 1$ entraîne des effets variables sur la prolifération et la survie dépendant du « background » des souris (Feltri et al., 2002). Ceci suggère que les laminines peuvent utiliser d'autres récepteurs pour réguler le nombre de cellules de Schwann. Le dystroglycane peut aussi fonctionner comme un récepteur de laminine (Previtali et al., 2001, 2003). Contrairement aux cellules de Schwann déficientes en intégrine $\beta 1$, l'ablation spécifique du dystroglycane des cellules de Schwann n'affecte pas de manière considérable le tri radial des axones. Cependant, les gaines de myéline des cellules de Schwann déficientes en dystroglycane sont anormalement enroulées et les canaux sodiques sont très réduits au niveau des nœuds de Ranvier (Saito et al., 2003). Ces résultats suggèrent que le dystroglycane fonctionne au stade tardif de la myélinisation dans le maintien de la gaine de myéline et joue un rôle particulier dans la formation des nœuds de Ranvier.

c. La signalisation des laminines dans la prolifération des cellules de Schwann

Du stade tardif embryonnaire au stade périnatal (E15 à P0 chez les souris), les cellules de Schwann immatures prolifèrent, subissent un réarrangement et entourent les axones (Stewart et al., 1993). Chez des mutants pour la laminine $\gamma 1$, la prolifération des cellules de Schwann est considérablement diminuée au cours du développement (Yang et al., 2005 ; Yu et al., 2005).

La déficience du tri des axones chez les cellules de Schwann ne possédant pas d'intégrine $\beta 1$ peut être causée par un mécanisme autre que la réduction de la prolifération des cellules de Schwann. Le tri radial axonal requiert une prolifération des cellules de Schwann et un processus d'extension qui sont régulés à travers deux voies distinctes : la prolifération est médiée par la neureguline1 et le processus d'extension dépend de la signalisation de l'intégrine $\beta 1$ (Benninger et al., 2007 ; Nodari et al., 2007). L'exposition des cultures de cellules de Schwann à la NRG1 induit une forte activation du gène Cdc42 (Benninger et al., 2007). La NRG1 induit aussi l'association de FAK au récepteur ErbB2/ErbB3 (Vartanian et al., 2000). La perte de Cdc42 ou FAK dans les cellules de Schwann entraîne une réduction de la prolifération des cellules de Schwann mais n'affecte pas le processus d'extension (Grove et al., 2007) indiquant que ces deux molécules agissent en aval de la NRG1/ErbB pour contrôler la prolifération des cellules de Schwann. Les laminines peuvent influencer la prolifération des cellules de Schwann à travers la voie de régulation NRG1/ErbB. Les axones sont la source majeure des mitogènes des cellules de Schwann.

6. Influence des cellules de Schwann sur la cellule nerveuse

Les cellules de Schwann sont importantes pour les neurones ; elles supportent leur survie, elles contrôlent la dynamique du cytosquelette et du transport axonal, elles contribuent à la conduction correcte de l'influx nerveux, elles modulent la transmission synaptique. Elles jouent un rôle prépondérant dans les situations traumatiques en stimulant la repousse des fibres nerveuses et la ré-innervation des plaques motrices, des propriétés réparatrices que les cellules de Schwann partagent uniquement avec la glie olfactive.

a. Les cellules de Schwann régulent le développement neuronal

Les cellules de Schwann sont une source de facteurs neurotrophiques : L'étude des mutants *erbB3*^{-/-} et des variants *erbB2*^{-/-} capables de vivre jusqu'à la naissance (grâce à une expression cardiaque de *erbB2*) a montré que non seulement les cellules de Schwann immatures meurent mais aussi les neurones rachidiens et les motoneurones (Lemke, Annu Rev. Neurosci, 2001, 24, 87-105). Ceci suggère que ces neurones dépendent de facteurs de survie gliaux. Une fois que le contact des cellules de Schwann et neurones est établi, ce sont les cellules de Schwann qui fournissent l'essentiel des signaux de survie neurotrophique. Ainsi à E12, la population de DRG

a un effectif normal mais elle chute à E14, le stade où auraient dû apparaître les précurseurs. Chez l'embryon normal, les précurseurs schwanniens et les cellules dérivées embryonnaires fourniraient des facteurs neurotrophiques aux neurones avant que ceux-ci ne dépendent de leurs cibles musculaires pour survivre. Parmi les candidats à la fonction de facteurs neurotrophiques gliaux figure le GDNF dont les ARNm ont été détectés dans la glie. Cependant, le GDNF ne semble pas être impliqué dans la survie des neurones rachidiens pendant leur interaction avec les précurseurs car à cette époque E12-E14, ils ne possèdent quasiment pas de récepteurs RET ou GDNF. Une autre série d'expériences désignerait la NT3 comme facteur produit par les précurseurs car dans les NT3 « knock-out », les neurones des DRG meurent, en partie, à un stade précoce du développement. A ce jour, aucun véritable facteur neurotrophique issu des précurseurs n'a été caractérisé. Par contre, il est clairement établi que les cellules de Schwann embryonnaires supportent la survie des neurones sensitifs et les motoneurones via le GDNF. Chez l'adulte, la survie des motoneurones est également soutenue par le CNTF associé au LIF. Toutes les observations portant sur des atteintes à l'intégrité de la glie périphérique (via des manipulations génétiques, des pathologies, des traumatismes, des toxicités) démontrent que la physiologie neuronale est fortement compromise en absence de cellules de Schwann saines.

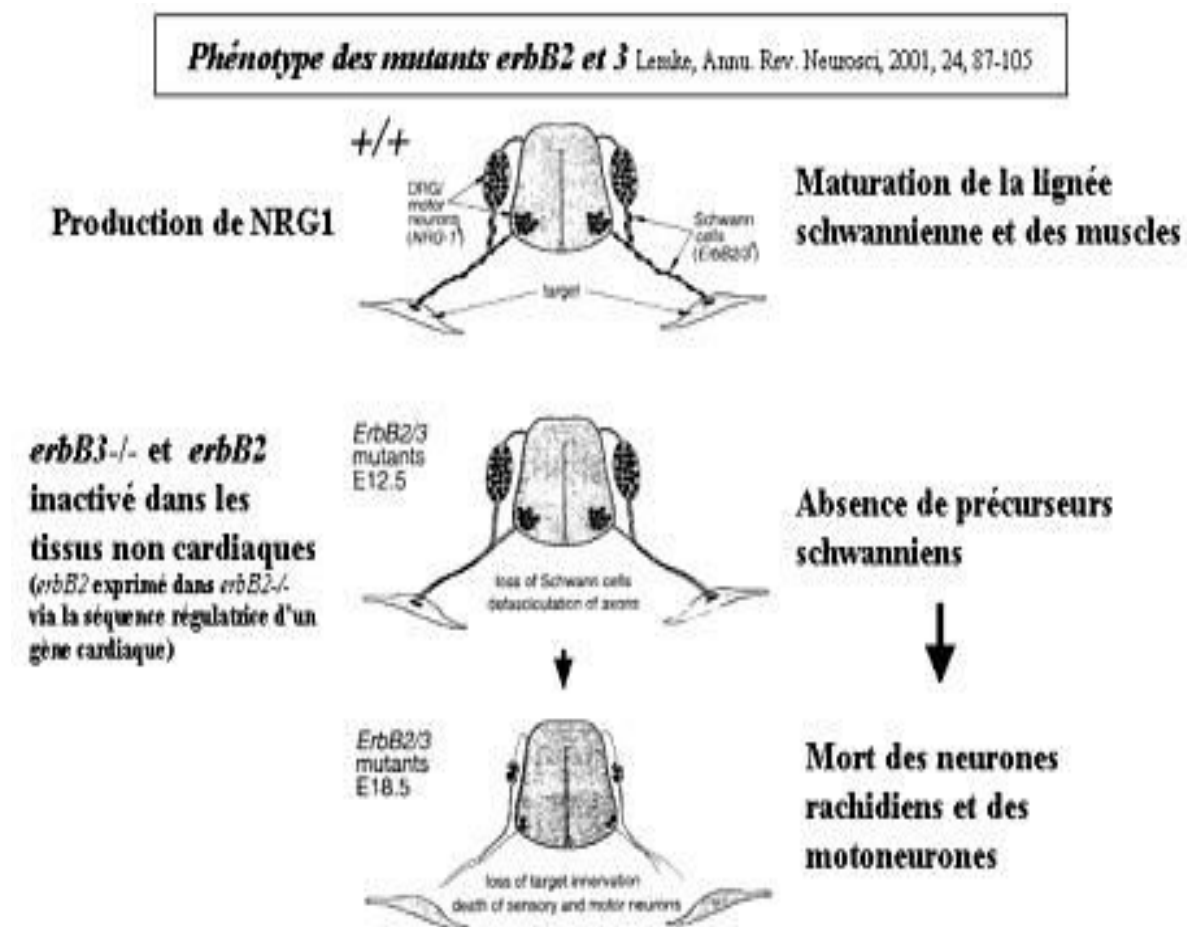


Figure 6: Le blocage de l'expression des récepteurs erbB2 ou 3 par mutation induit la disparition précoce de la lignée schwannienne dans les nerfs embryonnaires (dès E12.5). Plus tard (E18.5), l'absence de glie entraîne la mort des motoneurones et des neurones des DRG par défaut d'apport en facteurs neurotrophiques.

Les neurones exercent en retour, un effet stabilisant sur la survie et la différenciation des cellules de Schwann. Dans les nerfs matures, les cellules de Schwann atteignent des stades de différenciation qui reposent sur des signaux portés par les axones. Si ces derniers dégénèrent, les cellules de Schwann se différencient et se multiplient.

La membrane neuronale contient aussi des protéines particulières : la paranodine ou caspr faisant la jonction entre les cellules de Schwann par son domaine extracellulaire et le cytosquelette axonal, via la protéine 4.1. La paranodine participe à la jonction entre l'axolemmme et les boucles de la membrane schwannienne. Dans les oligodendrocytes (cellules myélinisantes du système nerveux central), au niveau de la région juxtaparanodale (entre la zone paranodale et l'internoeud), des canaux K⁺ voltage dépendants sont rassemblés grâce à leur liaison avec un analogue de la paranodine, Caspr2. (Poliak et al., Neuron, 24, 1037-1047). Le cytosquelette contient aussi des ankyrines qui forment un complexe avec 2 autres protéines : la neurofascine et la NCAM. Une des fonctions des ankyrines serait d'accrocher dans la membrane, les canaux Na⁺ voltage dépendants qui sont présents en très forte concentration dans la membrane axonale nodale. C'est la plus importante caractéristique fonctionnelle des nœuds de Ranvier.

b. Régulation postnatale de la relation entre les cellules de Schwann myélinisantes et neurones

Au cours de la phase postnatale, au moment de la séparation unitaire des axones de gros calibres par les cellules de Schwann myélinisantes, ces dernières entrent en compétition pour établir le contact avec les axones. Les cellules qui ne sont pas en contact avec des axones meurent par apoptose. Cette mort cellulaire permet une régulation fine de la population de cellules de Schwann myélinisantes afin d'aboutir à une relation stœchiométrique de 1/1 avec les axones. Le signal de mort programmé est activement médié par p75^{NTR} (Syroid et al., 2000) et non pas de manière passive, par défaut de contact axonal et du signal gliotrophique des NRG1. En effet, il a été montré in vitro que les cellules de Schwann ayant atteint le stade embryonnaire survivent sans contact axonal grâce à une stimulation autocrine-multifactorielle (NT3, IGFs, PDGF-BB ; Meier et al., 1999). Par contre, il a été aussi montré que l'application de la NRG sauve de

l'apoptose les cellules de Schwann ayant perdu le contact axonal pendant la période postnatale (Grinspan et al., 1996 ; Syroid et al., 2000 ; Trachtenberg and Thompson 1996).

7. Contrôle du développement et de la différenciation des cellules de Schwann

a. Rôle de la neureguline

Les neuregulines sont une famille de ligand ErbB/HER codés par 4 gènes. Le gène NRG1 code pour de nombreux variants d'épissage avec différents sites d'initiation de la transcription. Elle comprend une gamme d'isoformes avec des variations de la glycosylation, de la régulation de l'expression et de la fonction. Six types de l'isoforme 1 ont été définis sur la base de leurs caractéristiques structurelles. La neureguline 1 a été associée à la survenue de la schizophrénie et à diverses fonctions neuronales. La neureguline affecte la migration cellulaire, la différenciation des cellules de la crête neurale et des cellules de Schwann et régule positivement l'expression des récepteurs de l'acétylcholine aux fibres musculaires au cours de la formation des jonctions neuromusculaires. La signalisation de la neureguline-1 est importante à tous les stades du développement des cellules de Schwann depuis le stade de la crête neurale jusqu'à la différenciation finale des cellules de Schwann (Garratt et al., 2000b ; Lemke, 2006 ; Nave et Salzer, 2006). La neureguline-1 a été identifiée comme l'isoforme type II (Marchionni et al., 1993). Dérivée des axones, elle est considérée comme le mitogène majeur. Les souris n'exprimant pas la neureguline-1 ou les récepteurs ErbB2 et ErbB3 de la neureguline présentent des nerfs embryonnaires qui sont essentiellement dépourvus de précurseurs de cellules de Schwann, bien que le développement de la glie satellite dans les ganglions rachidiens postérieurs se fasse normalement (Meyer et Birchmeier, 1995 ; Riethmacher et al., 1997 ; Morris et al., 1999 ; Woldeyesus et al., 1999 ; Garratt et al., 2000b). Cependant, chez ces animaux, les ganglions sympathiques perdent leur capacité à se développer normalement (Britch et al., 1998). Ceci montre que la neureguline joue un rôle dans le développement embryonnaire du système nerveux périphérique. Bien que la neureguline-1 réprime fortement la formation des neurones à partir des cultures de cellules de la crête neurale, les mutants de neureguline ne fournissent aucune indication évidente, comme par exemple une surproduction de neurones, pour soutenir l'idée que la neureguline-1 limiterait la neurogénèse in vivo. La raison la plus importante pour la réduction remarquable ou l'absence de cellules de Schwann des troncs nerveux chez les mutants de neureguline est susceptible d'être reliée au rôle de la

neureguline-1 comme facteur de survie des précurseurs des cellules de Schwann et les cellules de Schwann précoces (Dong et al., 1995 ; Leimeroth et al., 2002; Jessen et Mirsky, 2005). Contrairement aux cellules de Schwann, les précurseurs des cellules de Schwann ne peuvent pas supporter leur propre survie par des mécanismes autocrines et ainsi dépendent exclusivement des signaux juxtacrines provenant des axones. Dans les nerfs en développement, ils sont directement appliqués aux axones et meurent rapidement quand elles sont éliminées du contact axonal soit en culture en absence d'axones, soit suite à une lésion du nerf in vivo (Jessen et al., 1994 ; Dong et al., 1995 ; Ciutat et al., 1996 ; Winseck et Oppenheim, 2006). Les isoformes de la neureguline-1 ont été trouvés dans les DRG embryonnaires, les neurones moteurs et accumulés le long des voies axonales (Marchionni et al., 1993 ; Loeb et al., 1999). En outre, les neurones des DRG en culture sont une source potentielle de signaux de survie sécrétés par les axones qui ont été identifiés comme des isoformes de la neureguline-1 (Dong et al., 1995; Taveggia et al., 2005). La neureguline-1 permet la survie des précurseurs des cellules de Schwann dans le nerf spinal embryonnaire. Les mutants dépourvus de l'isoforme III de la neureguline-1, isoforme majeur dans les nerfs périphériques confirment ces observations (Wolpowitz et al., 2000). Chez ces souris, les précurseurs des cellules de Schwann précoces commencent à peupler le nerf à E11 mais à E14, le moment où les cellules sont entrain d'être rapidement converties en cellules de Schwann, le nombre de cellules dans les nerfs baisse fortement. La neureguline-1 supporte aussi la survie de la glie précoce chez des nerfs de poussins embryonnaires (Winseck et Oppenheim, 2006). Ces observations suggèrent que la fonction majeure de la neureguline-1 est d'assurer la survie des précurseurs des cellules de Schwann. La migration défectueuse expliquerait le manque des précurseurs des cellules de Schwann dans les nerfs en développement chez des mutants de signaux de neureguline. Les animaux ayant subi une inactivation du gène de la neureguline-1 et par conséquent tous les trois isoformes ou les récepteurs ErbB2 et ErbB3 de la neureguline présentent tout de même des cellules de Schwann dans leur tronc nerveux périphérique. Les souris avec une inactivation sélective de l'isoforme III de la neureguline-1 présentent un phénotype intermédiaire, bien qu'aux stades tardifs, le nombre de précurseurs de cellules de Schwann soit fortement réduit et les cellules de Schwann sont absentes de la portion distale du nerf (Wolpowitz et al., 2000). En revanche, chez les souris sans l'isoforme I et II de la neureguline-1, la glie se développe normalement tandis que le développement du fuseau musculaire est déficient (Meyer et al., 1997 ; Hippenmeyer et al., 2002). Par conséquent, l'isoforme III est le plus important pour le développement des cellules de Schwann. Les isoformes I et II contiennent un domaine immunoglobuline liant l'héparine et sont clivés de la membrane par les métalloprotéases

formant des protéines solubles qui s'associent aux surfaces des cellules (Adlkofer et Lai, 2000 ; Nave et Salzer, 2006) tandis que l'isoforme III est surtout exprimé comme une protéine transmembranaire (Wang et al., 2001). Dans les membranes liées non solubles, l'isoforme III induit l'expression de S100 et d'Oct-6 dans les cultures de cellules non neuronales P0-positives provenant de DRG de rats embryonnaires (Leimeroth et al., 2002). Ceci montre qu'une des fonctions de la neureguline-1 est d'accélérer la transition de précurseurs de cellules de Schwann aux cellules de Schwann (Brennan et al., 2000).

L'importance de la neureguline-1 a été mise en évidence chez des souris ayant subi une excision conditionnelle de *erbB2* dans les cellules de Schwann ou de la neureguline-1 type III, soient ayant subi une induction de surexpression; chez ces souris, l'excision de *erbB2* ou l'haplo-insuffisance de la neureguline-1 type III entraîne une hypomyélinisation des nerfs périphériques tandis que sa surexpression dans les neurones entraîne une hypermyélinisation (Garratt et al., 2000a ; Michailov et al., 2004). Le manque de neureguline-1 type III dans les neurones de DRG a montré que cela entraîne un « ensheathment » axonal défectueux et une absence de myélinisation tandis que la surexpression du même isoforme dans les neurones sympathiques qui normalement en culture sont mal enveloppés et ne myélinisent pas, entraîne dans ce cas une myélinisation (Taveggia et al., 2005). Ces résultats montrent que la neureguline-1 type III régule l'épaisseur de la gaine de myéline et est importante pour l'« ensheathment » axonal et pourrait faire partie du mécanisme de signalisation provenant des axones qui contrôlent la myélinisation du système nerveux périphérique (Nave et Salzer, 2006). La neureguline-1 type III axonale est un mitogène majeur pour les cellules de Schwann au cours de la myélinisation bien que des notions plausibles chez des mammifères manquent (Nave et Salzer, 2006). Chez le poisson-zèbre, le blocage du récepteur *ErbB2* réduit la prolifération des cellules de Schwann *in vivo* (Lyons et al., 2005). Le seul facteur de croissance impliqué dans la conduite de la prolifération des cellules de Schwann de mammifère au cours du développement *in vivo* est le $TGF\beta$ (D'Antonio et al., 2006b).

b. Rôle de Notch

Le rôle de Notch dans le contrôle de la détermination du devenir des cellules de la crête neurale est complexe et n'est pas totalement compris sur beaucoup d'aspects. Son rôle spécifique à différents stades de la lignée des cellules de Schwann a été identifié. Il est hautement dépendant du type de cellules de la lignée dans lequel il agit. Il est peu probable que Notch joue un rôle d'induction dans le développement des cellules de la crête neurale en lignée de cellules de

Schwann (Wakamatsu et al., 2000). Krox20, qui joue un rôle majeur dans la promotion de la myélinisation, réprime Notch et cette répression est nécessaire pour une apparition rapide de la myélinisation dans le nerf périnatal. Comme Notch est réexprimé dans les nerfs lésés où il dirige la dédifférenciation des cellules de Schwann myélinisantes, l'effet commun de Notch dans le nerf en développement et le nerf lésé est de soutenir et de maintenir l'état immature ou dédifférencié des cellules de Schwann (Woodhoo et al., 2007, University College London, observations non publiées).

c. Rôle de TGF β

TGF β stimule la prolifération ou la mort des cellules de Schwann selon les conditions de culture utilisées (revu dans Jessen et Mirsky, 2003). Il a aussi été montré en utilisant des souris avec inactivation conditionnelle du récepteur TGF β type II (ce qui est à l'origine d'une suppression du signal de TGF β dans les cellules de Schwann) que la prolifération des cellules de Schwann dans le nerf périnatal de ces souris est substantiellement réduite. Cependant, la mort des cellules de Schwann présente une décroissance avec le résultat que le nombre des cellules de Schwann n'est pas significativement affecté en absence de signal de TGF β . L'importance biologique du signal de TGF β dans le nerf périnatal est d'amplifier la prolifération des cellules avec un contact axonal solide tout en favorisant la mort des cellules surnuméraires avec un contact axonal moins efficace. La perte du signal de TGF β in vivo n'affecte pas la myélinisation contrairement aux résultats obtenus en utilisant des systèmes de culture cellulaire (D'Antonio et al., 2006b).

B. La cellule nerveuse

Le neurone est un type de cellules différenciée composant avec les cellules gliales le tissu nerveux.

Les neurones constituent l'unité fonctionnelle du système nerveux, les cellules gliales assurant le soutien et la nutrition des neurones et jouant un rôle facilitant l'établissement de nouvelles connexions. Il y a environ 9 fois plus de cellules gliales que de neurones dans le cerveau. On estime que le système nerveux humain contient environ 100 milliards de neurones. Les neurones assurent la transmission d'un signal que l'on nomme influx nerveux.

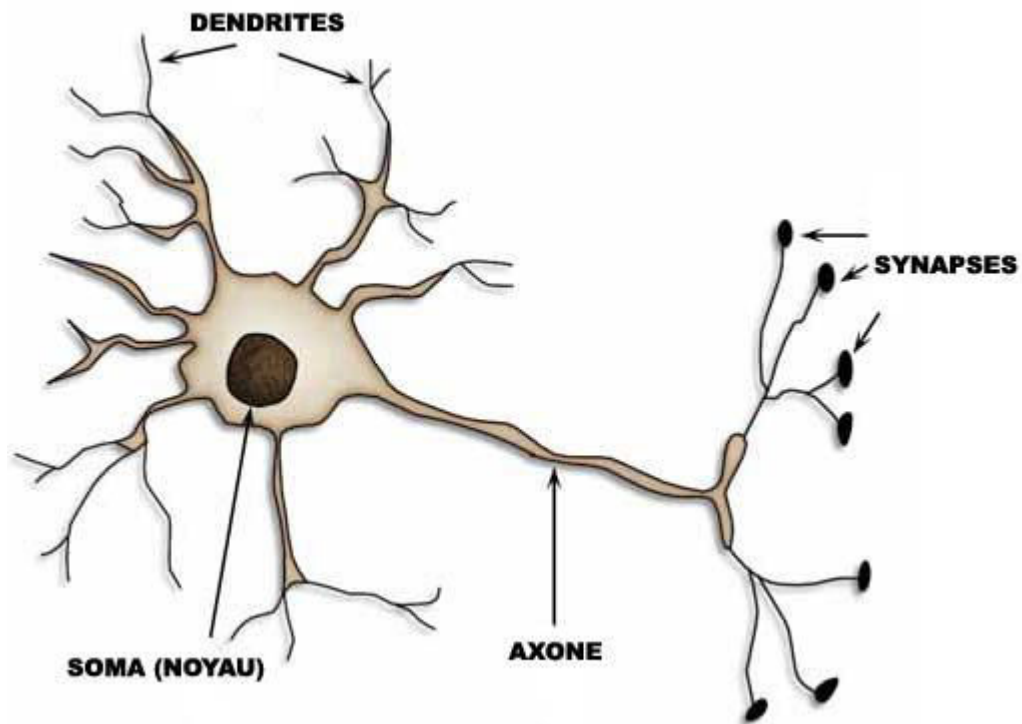


Figure7 : Schéma d'un neurone

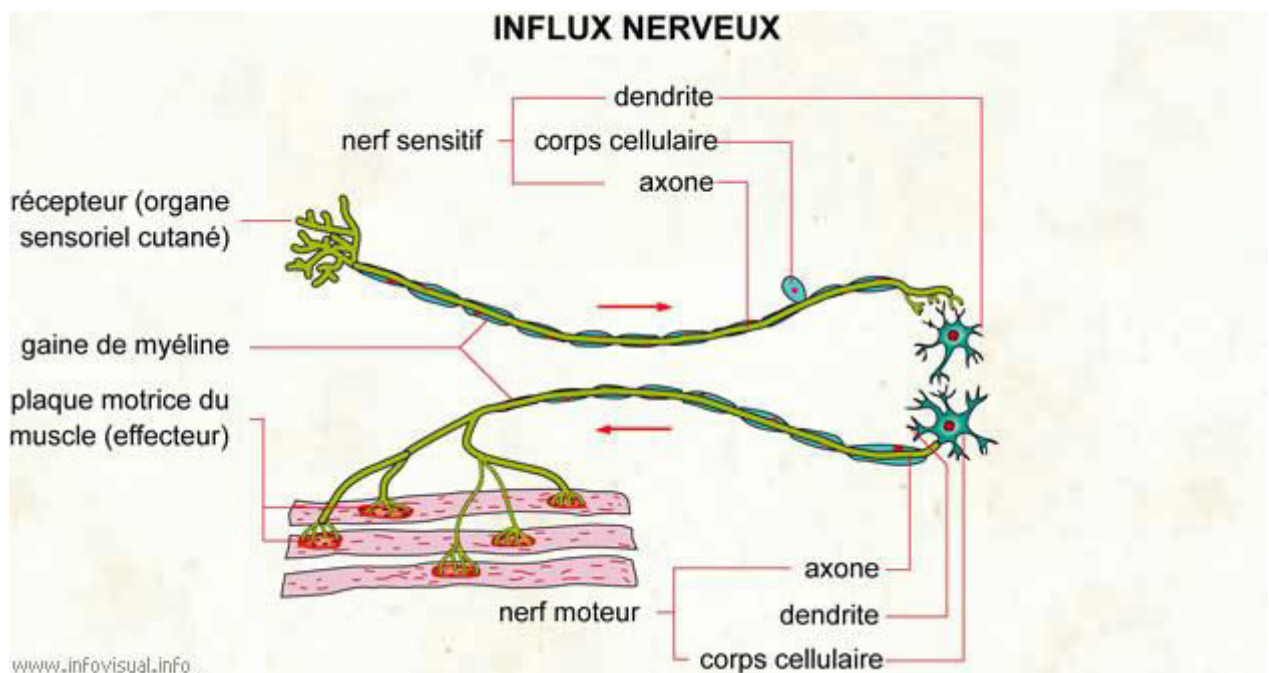


Figure8 : Circulation de l'influx nerveux

1. Classification fonctionnelle des neurones

Les neurones sensitifs conduisent l'influx nerveux des effecteurs vers le système nerveux central et les neurones moteurs dans le sens inverse. Les neurones d'association sont dans le système nerveux central et assurent la connexion entre les neurones sensitifs et moteurs. L'influx nerveux arrive des neurones sensitifs aux neurones d'association dans le système nerveux central qui le transmet aux neurones moteurs, il sera par la suite véhiculé aux effecteurs. Le neurone est constitué de corps cellulaires, de prolongements fins (axones et dendrites). L'axone long peut être entouré d'une gaine de myéline dans le cas des fibres myélinisées. L'influx nerveux arrive aux dendrites puis au corps cellulaire, s'éloigne à travers l'axone et se termine par les terminaisons nerveuses où il sera reçu par les dendrites du neurone suivant.

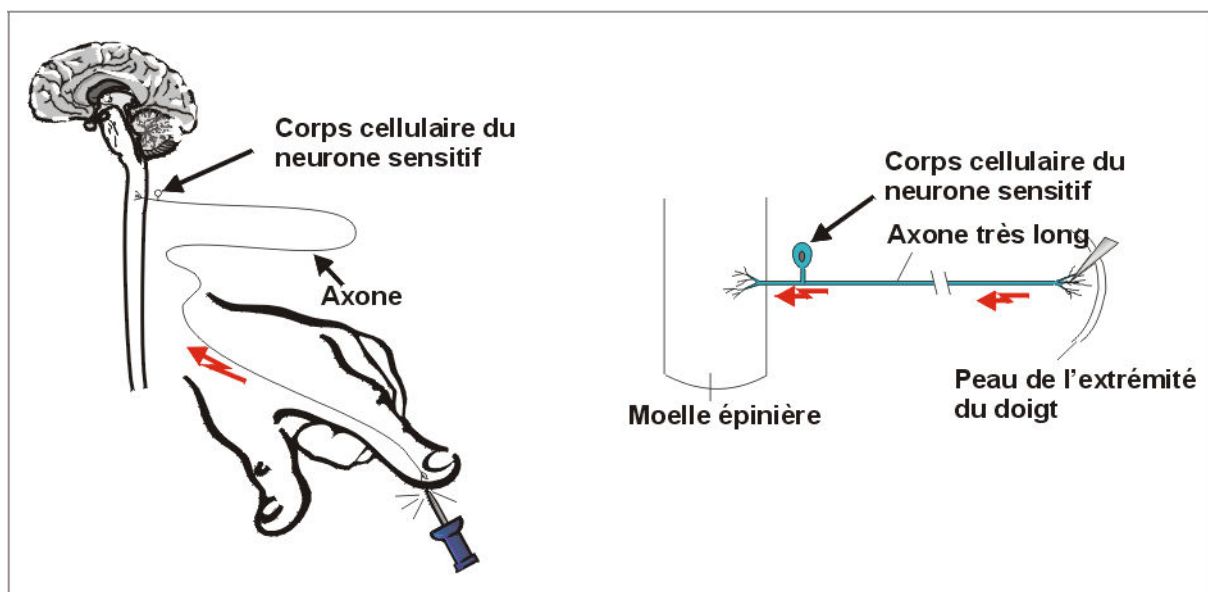


Figure9 : Neurone sensitif

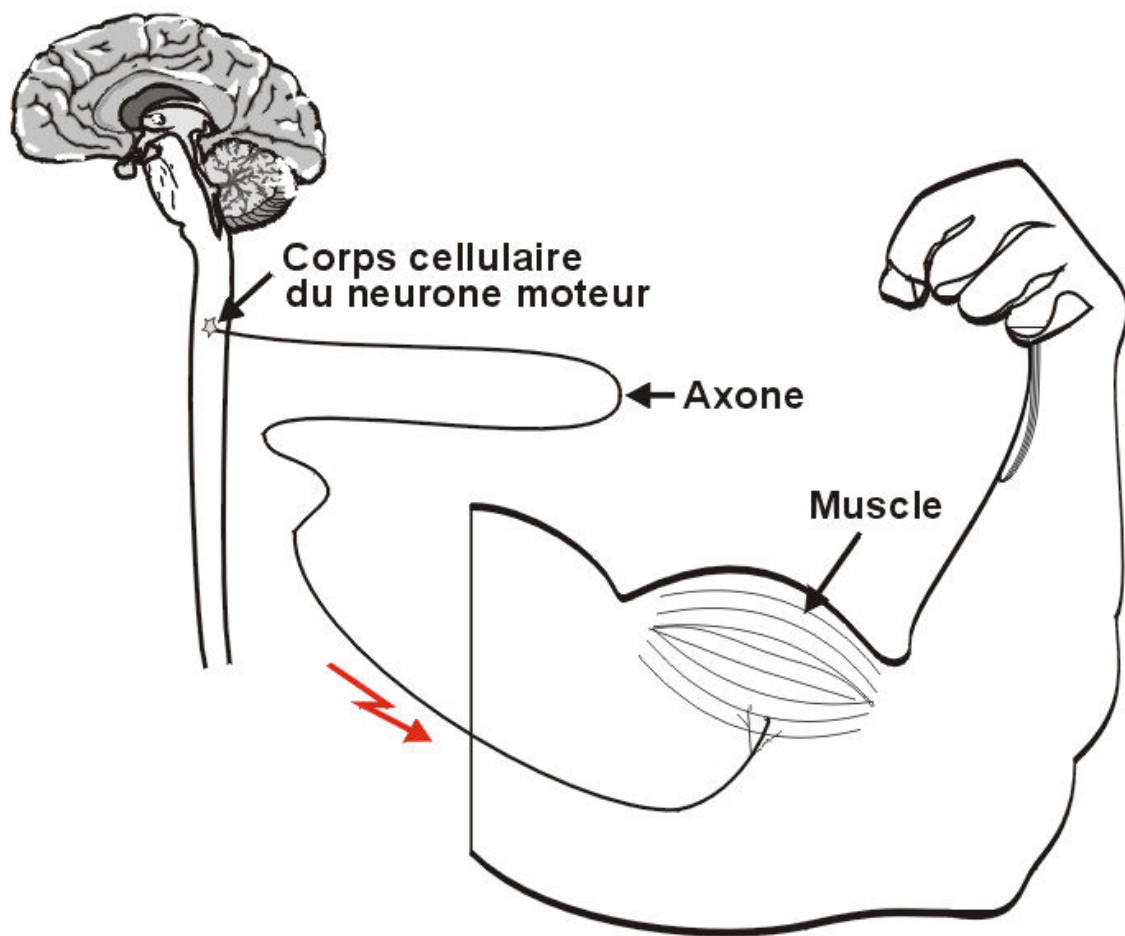


Figure10 : Neurone moteur

C. L'influx nerveux

L'influx nerveux est une activité électrique transmise le long d'un axone sous la forme d'une sequence de potentiels d'action. A la suite d'une stimulation, le recepteur sensoriel génère un influx nerveux qui se propage le long du nerf sensitif et se dirige vers le cerveau. A la suite d'une stimulation, les nerfs produisent un influx nerveux. Afin d'accomplir une action, les neurones du cerveau génèrent un influx nerveux qui se propage le long des nerfs moteurs et se dirige vers les organes effecteurs.

La vitesse de conduction de l'influx nerveux varie entre 3 km/ heure et 300 km par heure (0.83m/s et 83m/s). Elle depend du diamètre de la fibre nerveuse qui augmente la vitesse de conduction et de la myéline qui elle, augmente aussi cette vitesse en assurant une conduction saltatoire de l'influx. Dans les maladies telles que les formes démyélinisantes de neuropathie héréditaire sensitivomotrice (maladies de Charcot-Marie-Tooth de type 1), cette conduction est ralentie.

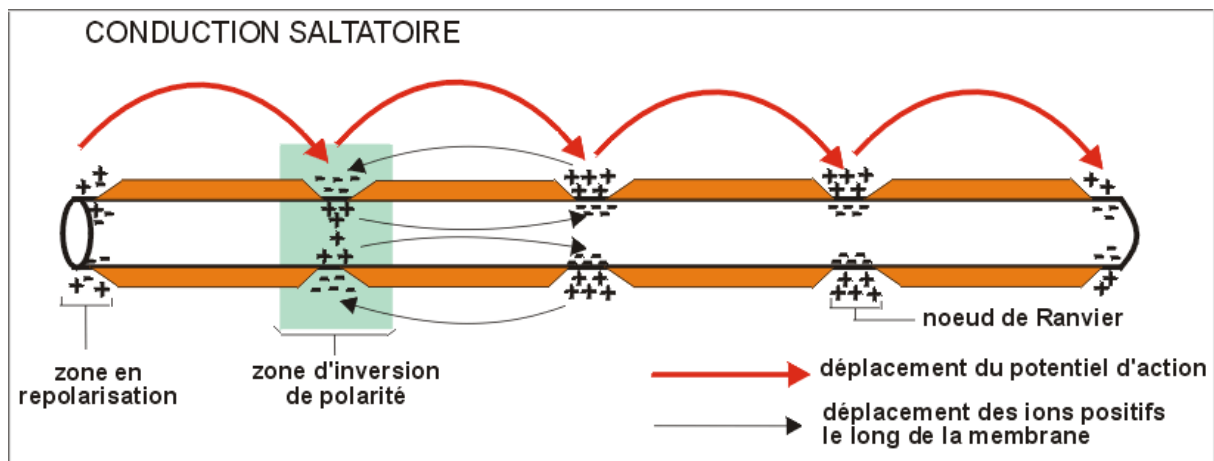


Figure11 : Conduction saltatoire de l'influx nerveux

D. La synapse et les neuromédiateurs

1. La synapse

La synapse est la jonction c'est-à-dire le point de connexion entre deux neurones. Un mm³ de substance grise du cortex peut contenir jusqu'à 5 milliards de synapses. On distingue habituellement deux types de synapses :

- La synapse chimique, très majoritaire qui utilise des neurotransmetteurs pour transmettre l'information ;
- La synapse électrique où le signal est transmis électriquement par l'intermédiaire d'une jonction communicante (en anglais gap-junction).

On les distingue au microscope électronique par la taille de la fente synaptique ; de l'ordre de 2 nanomètres pour les synapses électriques, entre 10 et 40 nm pour les synapses chimiques. On peut également, dans le cas des synapses électriques, observer les jonctions communicantes.



Figure 12 : Les synapses (D.CAILLOCE CCA, 2009)

2. Les neuromédiateurs

Ce sont l'adrénaline qui est sécrétée en réponse à un stress physique, la noradrénaline qui joue un rôle dans l'excitation, dans la vigilance, dans l'émotion, le réveil, le sommeil, la dopamine dont le rôle principal est d'inhiber la libération de prolactine par le lobe antérieur de l'hypophyse. L'adrénaline, la noradrénaline, la dopamine appartiennent à la famille des catécholamines. La sérotonine quant à elle joue un rôle dans l'entretien de l'homéostasie du cerveau. L'enképhaline est un neurotransmetteur libéré par les neurones à la suite d'une sensation de douleur intense. L'endorphine est sécrétée par l'hypophyse et l'hypothalamus lors d'activité physique, de douleur, d'excitation ou d'orgasme.

L'acétylcholine est un neurotransmetteur qui joue un rôle important aussi bien dans le système nerveux central où elle est impliquée dans la mémoire et l'apprentissage, que dans le système nerveux autonome, notamment dans l'activité musculaire et les fonctions végétatives. L'acétylcholine est un ester produit par l'enzyme choline acétyltransférase à partir de l'acétyl-coA dont l'action est médiée par les récepteurs nicotiniques et muscariniques. L'acétylcholine a un effet inhibiteur sur l'activité cardiaque. Cependant, au niveau de la jonction neuromusculaire, elle a un effet excitateur et au sein du système nerveux central, son action combine des effets neuromodulateurs sur la plasticité synaptique, l'apprentissage et l'activation physiologique.

II. LA MYÉLINE

La myéline est une substance constituée principalement de lipides (sphingomyéline) dont les couches alternent avec des couches de protides. De façon générale, la myéline sert à isoler et à protéger les fibres nerveuses, comme le fait le plastique autour des fils électriques.

Cette substance grasse est trouvée dans certaines cellules du système nerveux : les cellules de Schwann, situées dans le système nerveux périphérique...

La myéline mature se présente sous forme d'un feuilletage constitué par des lames denses concentriques régulières ou lignes périodiques de 3 nm séparées par des intervalles plus clairs d'environ 10 nm. Des lignes denses plus fines de 2 nm d'épaisseur, appelées lignes intrapériodiques, coupent en deux les espaces entre les lignes périodiques. Ce mécanisme, quelque fois dit du « gâteau roulé à la confiture » explique la formation de la myéline vue sur un nerf en coupe transversale, mais il est également nécessaire de mettre en évidence le processus en coupe longitudinale particulièrement en regard des étranglements ou nœuds de Ranvier. Sur une telle coupe, on voit les lamelles de myéline se raccourcir progressivement depuis la lamelle externe jusqu'à la lamelle interne. Quand les fibres nerveuses se divisent, elles le font au niveau d'un étranglement de Ranvier. Aussi, en coupe transversale, on peut voir qu'un espace péri-axonal de 15 à 20 nm est en continuité par l'intermédiaire du mesaxon interne.

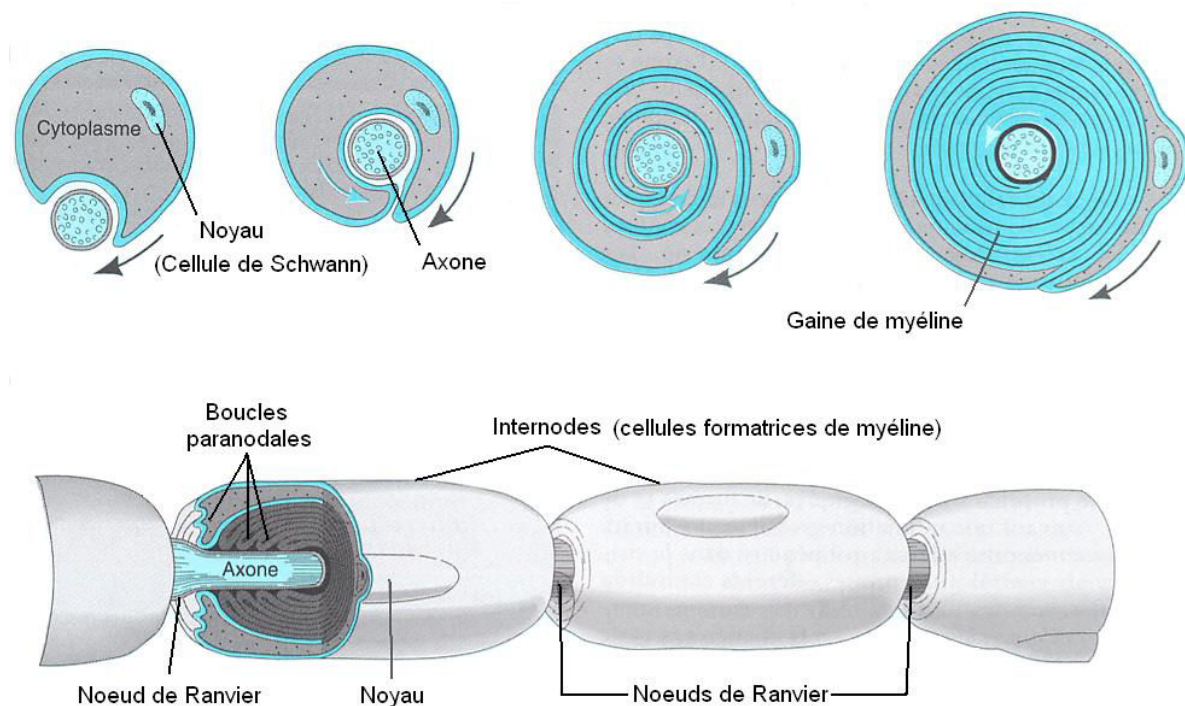


Figure 13: La gaine de myéline se forme surtout au cours du développement postnatal par l'élaboration d'une spirale cytoplasmique autour de la fibre. Le cytoplasme est ensuite éliminé de cette spirale qui est composée d'un empilement concentrique de membrane. Les couches de membrane, qui peuvent être au nombre de quelques centaines, constituent la myéline compacte. Outre l'absence de cytoplasme, la myéline se caractérise par la présence de protéines spécifiques comme la PLP et la P0 qui assurent par adhésion homologue la jonction entre les différents feuilletts membranaires alors que l'adhésion de la cellule de Schwann sur la fibre nerveuse est en partie accomplie par la protéine MAG.

Dans les fibres myélinisées du système nerveux périphérique, la fibre nerveuse est entourée par une gaine tubulaire de myéline qui, à l'état frais, est hautement réfringente et blanche (la myéline est responsable de la couleur blanche du cerveau et de la moelle épinière). La myéline étant largement composée de lipides, est dissoute après les méthodes de fixation habituelle, laissant un réseau de substance protéique appelée neurokératine autour de la fibre nerveuse. La myéline peut être fixée et colorée en noir par le tetroxyde d'osmium. Après fixation bichromatée, elle se colore bien à l'hématoxyline. En microscopie optique, on voit la gaine de myéline sous forme d'un cylindre incomplet ou interrompu, car à des intervalles réguliers, il existe des interruptions dans la gaine : elles portent le nom d'étranglements ou nœuds de Ranvier, et la portion entre deux étranglements celui de segments de Ranvier. Recouvrant la myéline de chaque segment et responsable de sa formation, se trouve une seule cellule de Schwann ; c'est-à-dire que les cellules de Schwann s'étendent bout à bout le long d'une fibre myélinisée comme elles le font dans les fibres non myélinisées, chaque cellule recouvrant un segment de Ranvier. Les segments ont tendance à être plus longs dans les fibres nerveuses épaisses que dans les fines. La microscopie électronique met en évidence que la myéline n'est pas dépourvue de structure, qu'elle n'est pas extracellulaire mais qu'elle est constituée d'une série de couches concentriques de membrane plasmique de cellule de Schwann (Figure ci-dessus).

A. Les protéines myéliniques

La gaine de myéline est une membrane multicouche, unique pour le système nerveux, qui fonctionne comme un isolateur pour augmenter considérablement la vitesse de conduction de l'influx nerveux. La myéline est composée de lipides associés à diverses protéines, dont certaines sont communes à la myéline centrale (SNC) et à la myéline périphérique (nerfs) tandis que d'autres sont spécifiques de la forme centrale ou de la forme périphérique. Ainsi, la protéine

protéolipide (PLP), protéine majeure constituante de la myéline du système nerveux central, est seulement présente à des niveaux très bas dans la myéline du système nerveux périphérique (Lemke, 1992). La gaine de myéline affiche une architecture moléculaire unique qui dépend de la synthèse des protéines régulées et de leur transport. La glie myélinisante (les cellules de Schwann dans les nerfs périphériques, les oligodendrocytes dans le cerveau et la moelle épinière) doivent produire 3 fois leur masse en protéine et lipide par jour au cours de la myélinogenèse (Norton et Poduslo, 1973). La synthèse coordonnée des protéines de myéline est en partie médiée transcriptionnellement, par un niveau élevé de transcription de gènes codant pour des protéines spécifiques de myéline et est induite simultanément au cours de la myélinogenèse (Stahl et al., 1990 ; Scherer et al., 1994 ; Wrabetz et al., 1998). Le transport de ces ARNm et protéines est régulé soigneusement. Des situations pathologiques (mutations à l'origine de maladies génétiques ou animaux transgéniques) révèlent qu'un dosage précis de l'expression de ces gènes est nécessaire pour une myélinisation normale. Par exemple, le gain ou la perte d'un seul allèle de PLP ou de PMP22 produit des myélinopathies du système nerveux central ou des neuropathies périphériques démyélinisantes chez l'homme (Nave et Boespflug-Tanguy, 1996) et des doses similaires altérées de PLP et de PMP22 sont à l'origine de ces maladies chez des rongeurs transgéniques (PLP : Boison et Stoffel, 1994 ; Kagawa et al., 1994 ; Readhead et al., 1994 ; Klugmann et al., 1997 et PMP22 : Adlkofer et al., 1995 ; Magyar et al., 1996 ; Sereda et al., 1996, Huxley et al., 1998). La manière selon laquelle une expression anormale de PLP entraîne une myéline défectueuse n'est pas claire mais une surexpression de PMP22 a une repercussion sur la gaine de myéline (Vallat et al., 1996) destabilisant éventuellement sa formation ou sa maintenance. Les observations que des mutations dans différents gènes de la myéline entraînent des maladies de phénotypes similaires impliquent que différentes protéines myéliniques interagissent au niveau de leurs unités fonctionnelles. Dans ce même sens, des interactions physiques entre PMP22 et P0 ont été détectées au niveau de la myéline (D'Urso et al., 1999) soutenant que des assemblages multi-protéiques existent dans la gaine de myéline. Ainsi, la destabilisation de la formation de la myéline due à des doses anormales de gène de myéline peut refléter un besoin de stœchiométrie stricte au cours du transport et l'assemblage de la protéine à la gaine de myéline.

1. MBP

La protéine basique de la myéline (MBP) est une protéine présente à la fois dans la myéline centrale et la myéline périphérique, et qui joue un rôle important dans le processus de

myélinisation des nerfs dans le système nerveux. L'ARNm codant pour la MBP est transporté à proximité du cytoplasme de la gaine de myéline où la MBP est synthétisée par des ribosomes libres et incorporée rapidement dans la myéline (Colman et al., 1982 ; Trapp et al., 1987 ; Griffiths et al., 1989). L'intérêt pour MBP est centré sur son rôle dans les maladies démyélinisantes, en particulier, la sclérose en plaques (SEP). Plusieurs études ont démontré un rôle pour les anticorps anti-MBP dans la pathogenèse de la sclérose en plaques.

2. P0

Dans les cellules de Schwann myélinisantes, la protéine P0 est synthétisée dans le RER et transportée via l'appareil de Golgi pour participer à la synthèse de la gaine de myéline (D'Urso et al., 1990 ; Trapp et al., 1995). La P0 représente à elle seule plus de la moitié des protéines totales du système nerveux périphérique mais elle est aussi trouvée dans le système nerveux central. Les ARNm de P0 (8% des ARNm totaux) et la protéine (>50% des protéines de la myéline périphérique; Greenfield et al., 1973) sont de loin les plus abondants dans le nerf. P0 est une protéine transmembranaire avec une queue cytoplasmique enrichie en résidus basiques (Lemke et Axel., 1985 ; Shapiro et al., 1996). Le domaine extracellulaire de P0 participe à des interactions homophiles (D'Urso et al., 1990 ; Schneider-Schaulies et al., 1990 ; Shapiro et al., 1996) qui assurent la cohésion entre les tours de spires de la membrane plasmique des cellules de Schwann au cours de la formation de la myéline. Ainsi, les extrémités C-terminales des protéines P0 qui se font face sur deux spires de membranes de cellules de Schwann adjacentes s'ancrent les unes aux autres, assurant une compaction optimale de la myéline périphérique. On constate logiquement que des souris dépourvues de P0 (knock-out du gène) présentent un aspect de non-compaction de la gaine de myéline (Giese et al., 1992). Les conséquences phénotypiques d'une surexpression de P0 ont été explorées en utilisant des animaux transgéniques (Wrabetz et al., 2000). Les données montrent que le gène de P0 doit être précisément régulé, que la surexpression de P0 est à l'origine d'une neuropathie périphérique avec dysmyélinisation. Deux mécanismes pathogéniques possibles ont été identifiés : premièrement, l'augmentation de la surexpression de P0 deregule l'expression stœchiométrique d'autres gènes de myéline. Deuxièmement, la surexpression de P0 favorise son transport inapproprié à la surface des cellules de Schwann (Yin et al., 2000). Ces résultats montrent que des neuropathies humaines (telle que la CMT1A) dépendent de la coordination et du transport des protéines de myéline dans les nerfs en développement. Dans des nerfs fémoraux à P10 chez des animaux Tg80.2, la

partie motrice (quadriceps) est plus démyélinisée que la partie sensitive. De plus, les racines ventrales sont très démyélinisées chez ces animaux. Comme dans beaucoup de modèles de rongeurs, les fibres motrices sont relativement plus démyélinisées que les fibres sensibles chez les souris Tg80.

La démyélinisation pourrait représenter une réponse non spécifique à la surexpression des glycoprotéines. Cependant, même si la différenciation des cellules de Schwann est stoppée suite à des niveaux anormaux de plusieurs gènes impliqués dans la myélinisation (certains codant pour des glycoprotéines), les caractéristiques morphologiques spécifiques distinguent chaque phénotype (MPZ : Giese et al., 1992 ; PMP22 : Adlkofer et al., 1995 ; Magyar et al., 1996 ; Sereda et al., 1996 ; Huxley et al., 1998 ; Oct6 : Bermingham et al., 1996 ; Jaegle et al., 1996 ; Krox20 : Topilko et al., 1994). En particulier, l'arrêt du développement au stade de tri des axones de gros calibres à partir des faisceaux d'axones nus est une caractéristique unique qui fait suite à la surexpression de P0, suggérant un effet précoce dans le développement du nerf. [Les données de Yin et al., en 2000 démontrent que les caractéristiques morphologiques communes ne correspondent pas toujours à un dysfonctionnement spécifique des cellules de Schwann. Les cellules de Schwann ayant établi une relation 1 : 1 avec des axones chez des souris transgéniques pour P0 présentent un espace mesaxonal rétréci alors que les mêmes cellules chez des souris surexprimant PMP22 n'a pas de mesaxone rétréci (Yin et al., 2000, Huxley et al., 1998).

3. PMP22

PMP22, une glycoprotéine de 22 kDa, constitue approximativement 2 à 5% des protéines totales dans le système nerveux périphérique (Pareek et al., 1993). La structure de PMP22 est donnée par la séquence de ses acides aminés (Welcher et al., 1991). Des études de traduction *in vitro* (Manfioletti et al., 1990) et de marquage d'épitope (D'Urso et Muller, 1997) ont mis en évidence 4 domaines transmembranaires (C et N-terminal à orientation intracellulaire) avec deux boucles extracellulaires et une séquence de N-glycosylation dans la première boucle extracellulaire. Ce site de glycosylation est conservé parmi les membres de la famille de gènes de PMP22 (Marvin et al., 1995 ; Taylor et al., 1995). Dans la protéine PMP22 se trouve l'épitope carbohydrate L2/HNK-1 (Snipes et al., 1993 ; Hammer et al., 1993), qui est présent dans un nombre de molécule d'adhésion/reconnaissance (revue, Schachner et Martini, 1995). Ainsi, s'il est exprimé suffisamment tôt, PMP22 pourrait jouer un rôle dans l'interaction entre

cellules de Schwann et axones. Le cDNA de PMP22 est identique à gas-3, un cDNA qui est régulé positivement dans les fibroblastes quiescents de souris (Manfioletti et al., 1990). Cette constatation montre que PMP22 peut avoir un rôle dans la différenciation des cellules de Schwann ; des niveaux élevés d'expression de PMP22 par les cellules de Schwann sont associés à un état différencié, non prolifératif de cellules de Schwann, un état caractéristique des cellules de Schwann myélinisantes. De plus, plusieurs études ont montré une corrélation inverse entre les niveaux d'expression de PMP22 et la cinétique du cycle cellulaire (Zoidl et al., 1997). L'expression in vitro de PMP22 par des cellules de Schwann en absence de neurones est beaucoup plus faible qu'in vivo (Pareek et al., 1993, 1997), suggérant une influence axonale sur l'expression de la protéine PMP22, ce qui est le cas pour d'autres protéines de myéline. A la suite de la description initiale du gène et de la protéine PMP22, des mutations y ont été identifiées à l'origine de plusieurs types de neuropathies héréditaires (revue de snipes et Suter, 1995a, b). Des duplications du locus PMP22 ou des mutations ponctuelles du gène PMP22 sont associées à un groupe hétérogène de neuropathies humaines héréditaires et démyélinisantes, incluant le type 1A de la maladie de Charcot Marie Tooth. Des mutations ponctuelles de PMP22 sont aussi impliquées dans la pathologie de deux modèles de neuropathies périphériques chez des souris appelées Tr et Tr-J (Suter et al., 1992a,b). Chez des animaux Tr-J hétérozygotes, des valeurs plus élevées de PMP22 ont été rapportées (Notterpek et al., 1997). Cette étude et bien d'autres suggèrent que le type sauvage de PMP22 peut avoir un rôle stabilisant dans la myéline. L'expression de PMP22 de mutant entraîne des niveaux élevés de myéline provenant d'altérations morphologiques dans des nerfs de modèles animaux de PMP22 développant des neuropathies (Notterpek et al., 1997 ; et revue de Martini et Schachner, 1997).

Tenant compte de la structure, l'expression in vivo, l'implication dans des troubles de démyélinisation et des caractéristiques structurales de PMP22, l'expression normale de PMP22 serait requise pour la myélinisation ainsi que sa maintenance. Afin d'élucider le (s) rôle (s) de PMP22 dans la myélinisation, le profil d'expression de la protéine a été examiné au cours de la myélinisation in vitro et comparé à d'autres composants connus de myéline tels que MAG, P0 et MBP. PMP22 est exprimé après GalC et MAG, coïncide avec P0 et précède MBP. Le niveau de PMP22 augmente significativement au cours du stade tardif de la formation de la myéline et est stimulé par la progestérone.

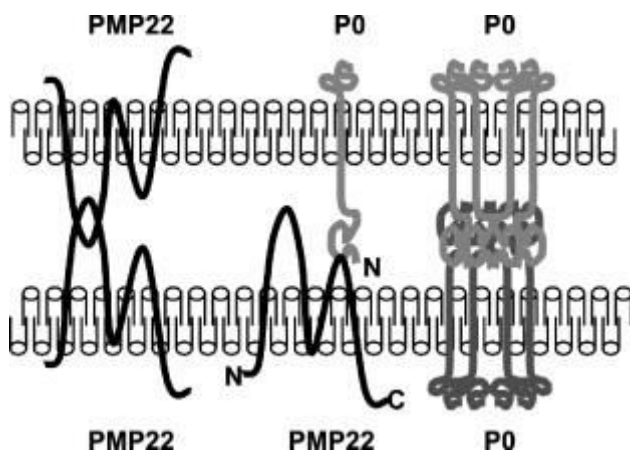


Figure14 : Représentation schématique des trans-interactions adhésives homophiles et hétérophiles de protéines membranaires intégrales PMP22 et P0 dans la myéline périphérique (Hasse et al., 2004)

a. L'expression de PMP22 est stimulée par la progestérone au cours de la myélinogenèse in vitro

L'expression de PMP22 a été examinée au cours de la myélinisation in vitro dans un système de culture qui permet le contrôle de plusieurs étapes qui influencent l'interaction axone-cellule de Schwann (Wood et al., 1990). Dans les cellules de Schwann non myélinisantes, cultivées en présence de forskolin, des niveaux bas de MAG, de P0 et de PMP22 ont été détectés. Les résultats initiaux d'études in vitro ont varié avec les données in vivo et plus particulièrement au niveau de l'expression de protéines de myéline, l'augmentation du temps de formation de la myéline et l'association de MAG et plus tard l'expression de P0 avec la formation de la myéline. L'interprétation de ces résultats est que la formation de la myéline compacte in vitro est relativement inefficace, donnant des niveaux presque indétectables de PMP22 et MBP comparativement à MAG et P0. Les profils d'expression de ces études in vitro ont suggéré que MAG et P0 étaient impliqués dans la formation précoce de la myéline, en absence d'une expression significative de PMP22 et de MBP. Une autre possibilité est que les niveaux de PMP22 et de MBP augmentent mais sont à la limite de la détectabilité pour ces anticorps. En effet, les différents anticorps anti-protéines myéliniques sont susceptibles d'avoir des sensibilités de détection différentes.

Afin de stimuler la myélinisation, de la progestérone a été ajoutée à des cultures conformément aux travaux de Koenig et ses collègues qui ont observé que la progestérone a un grand effet positif sur l'efficacité de la myélinisation (Koenig et al., 1995). En accord avec ces études, il est montré qu'un ajout de progestérone améliore significativement les niveaux d'expression

des protéines P0, MBP, PMP22 tandis que le niveau de MAG augmente faiblement. En présence de progestérone et d'ascorbate, MAG est détecté à son niveau le plus élevé dans des cocultures et atteint ce niveau maximal une semaine après l'addition de ces deux composants. En présence de progestérone, le profil d'expression temporel de P0 et de PMP22 in vitro sont similaires mais retardé par rapport à l'expression de MAG et atteint tous les deux la moitié de la valeur maximale entre les semaines 1 et 2 du traitement ascorbate/progestérone. Ces changements ont lieu après la formation de la lame basale suivant l'addition de sérum et d'ascorbate au milieu de culture. Le niveau de MBP atteint la moitié de la valeur maximale en deux semaines dans des conditions de myélinisation (c'est-à-dire des cellules à l'âge de 3 semaines). Bien qu'il y ait des variations sur le niveau d'expression des protéines de myéline entre les cocultures, l'ajout de la progestérone améliore la formation de la myéline. L'effet stimulant de la progestérone sur la formation de la myéline a été mis en évidence par immunomarquage dans des cultures avec des anticorps anti-P0 et anti-MBP. L'effet de la progestérone sur l'expression de PMP22 est similaire à celui de P0 et de MBP. Le nombre de segments de MAG augmente aussi considérablement.

b. PMP22 se déplace à la membrane plasmique des cellules de Schwann après la formation de la lame basale

Dans des cocultures myélinisantes, PMP22 est trouvée dans des segments de myéline (Pareek et al., 1997). Des cocultures de neurones de DRG et de cellules de Schwann ont été suivies à des stades précoces de la myélinisation in vitro pour déterminer à quelle période PMP22 se déplace à la membrane plasmique des cellules de Schwann. La détection de PMP22 dans les cocultures au niveau d'une seule cellule par immunocytochimie est plus sensible que la détection par western blots de lysats de coculture reflétant qu'il est peut être possible de voir la concentration de PMP22 à des sites spécifiques des cellules de Schwann, PMP22 reste dans le corps cellulaire (Pareek et al., 1997) dans des cocultures où les cellules de Schwann sont en contact avec des axones mais ne peuvent pas former une lame basale (pas d'ascorbate dans le milieu de culture). Trois à quatre jours après l'addition d'ascorbate et de sérum, PMP22 peut être détectée dans des segments de myéline. Dans cette situation, PMP22 est détectée dans la membrane cellulaire de la majorité des cellules de Schwann myélinisantes. En plus, plusieurs segments de myéline positifs à anti-GalC ont été identifiés et qui restent négatifs à PMP22. Le marquage des noyaux a montré que dans ces régions, la grande quantité de PMP22 reste concentrée à la région périnucléaire de la cellule de Schwann plutôt que dans la membrane

cellulaire. Ces résultats montrent que PMP22 se déplace à la membrane cellulaire des cellules de Schwann après la formation de la lame basale et après que les cellules de Schwann aient commencé leur enroulement initial autour des axones.

c. Le profil d'expression temporelle de PMP22 est similaire à celui de P0 au cours de la myélinisation in vivo

Il est montré que les niveaux d'ARNm de PMP22 et de celui de P0 dans les nerfs sciatiques en développement étaient corrélés à la myélinisation (Snipes et al., 1992). Le profil d'expression temporel de PMP22 était similaire à celui de MBP, un constituant tardif de la myéline du système nerveux périphérique. L'expression de la protéine PMP22 a été examinée au cours des stades précoces de la myélinisation in vivo et in vitro afin de déterminer si PMP22 est présent à ces moments et s'il peut avoir un rôle dans les interactions initiales entre axones et cellules de Schwann. Les niveaux de PMP22, de MAG, de P0 et de MBP ont été mesurés en fonction du temps au cours du développement afin de déterminer le temps requis pour atteindre les niveaux trouvés dans la myéline mature. La comparaison de ces niveaux fournit une mesure qualitative de la formation de la myéline. Par western blot, il est montré que le niveau de la protéine PMP22 était en dessous des limites détectables dans la période immédiate postnatale et atteint la moitié des valeurs maximales entre le 10^{ème} et le 15^{ème} jour de la période postnatale. En utilisant un système de détection luminescente, PMP22 a été facilement détectée à ces périodes précoces et atteint la moitié du niveau maximal vers le 3^{ème} jour quand l'analyse a été faite au delà de trois semaines du développement postnatal. Par comparaison, la MAG, une molécule distribuée le long de l'axone au cours de la première phase de la myélinisation, est facilement détectée à J1 et atteint son expression maximale à J4 environ, laissant supposer que la MAG serait impliquée dans l'interaction initiale entre axone et cellule de Schwann (revue de Martini et Schachner, 1997 ; Yin et al., 1998),.

III. Les Nœuds de Ranvier : structure et fonctionnement

Le nœud de Ranvier, à proprement parler, est la partie de l'axone non recouverte par la myéline. Le nœud de Ranvier est vital pour le fonctionnement du neurone car il contient tout le complexe appareillage moléculaire nécessaire à la propagation rapide du potentiel d'action. Au

du tronçon axonal non myélinisé sont concentrés des canaux Na^+ voltage-dépendants indispensable à la genèse du potentiel d'action. Du côté des extrémités des cellules de Schwann, on observe la présence dans les boucles paranodales de canaux K^+ voltage-dépendants vraisemblablement impliqués dans le contrôle de l'environnement ionique du nœud (*évacuation du K^+ libéré par le neurone pendant la phase de repolarisation ionique, présence aussi de la connexine 32 composante des gap junctions entre les boucles paranodales, des protéines d'adhésion E cadhérine et MAG (myelin associated glycoprotein)*). Cette zone de forte interaction membranaire avec l'axolemme pourrait servir à fixer le manchon de myéline sur l'axone, d'isoler sous la myéline l'espace périaxonal de l'activité électrique des nœuds et de limiter la diffusion latérale des molécules de la membrane.

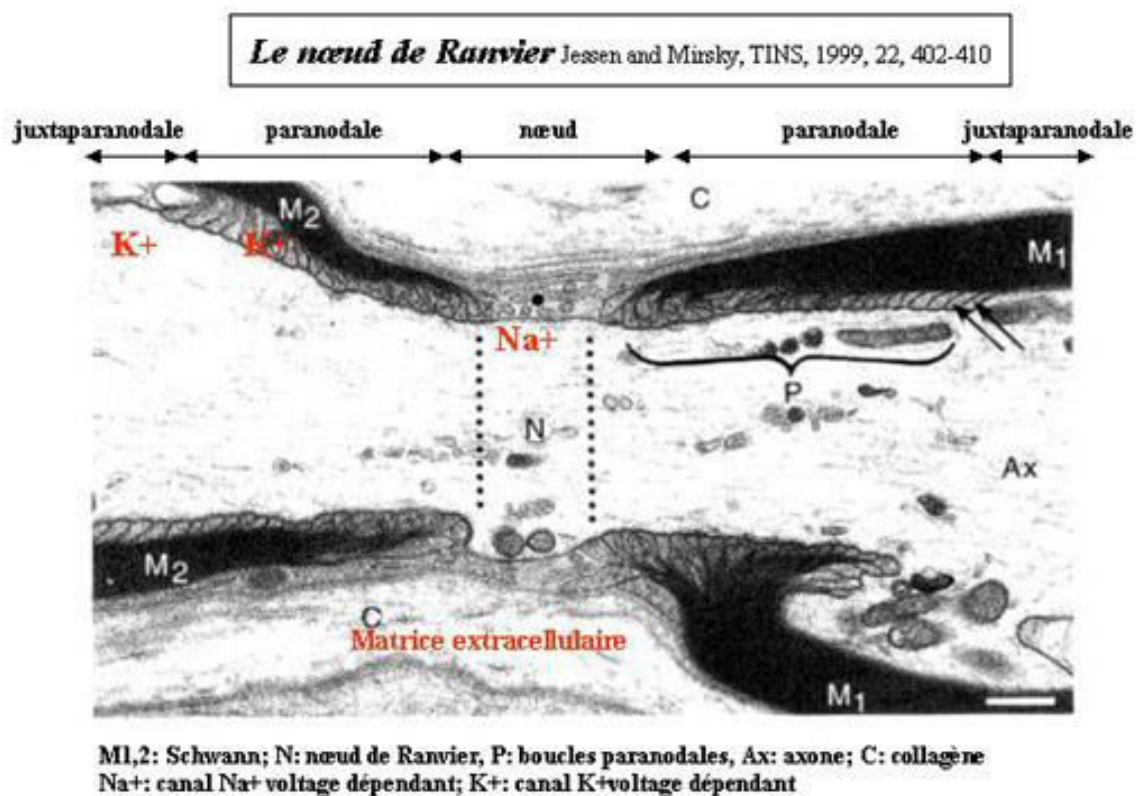


Figure 15: Coupe longitudinale d'un nœud de Ranvier. Le nœud de Ranvier, à proprement parler, est la partie de l'axone non recouverte par la myéline. C'est le site de concentration des canaux Na^+ voltage-dépendants indispensable à la genèse du potentiel d'action. Les canaux K^+ voltage dépendants se trouvent surtout dans la zone paranodale qui correspond aux extrémités des manchons de myéline. Le diamètre de l'axone est supérieur dans les zones myélinisées que dans le nœud de Ranvier.

Chapitre I: Les regulateurs de la myélinisation

I. Répression génique au cours de la myélinisation

A. Le contrôle transcriptionnel de la myélinisation

Les signaux à l'origine de la myélinisation convergent sur un certain nombre de facteurs de transcription (protéines interagissant avec les zones régulatrices de leurs gènes-cibles pour en moduler le niveau d'expression) pour conduire la transition d'immatures, de cellules prolifératives promyélinisantes aux cellules myélinisantes. Plusieurs facteurs de transcription ont été découverts pour jouer des rôles clés dans cette transition et l'exécution du programme transcriptionnel dirigeant la myélinisation. Ces facteurs de transcription, leur rapport de régulation et les voies de signalisation intracellulaire qui modulent leur activité ont fait l'objet de nombreuses études. Ces études ont révélé différents circuits de régulation de la myélinisation du système nerveux périphérique. Un circuit de promotion de la myélinisation, composé de Sox10 et des facteurs à domaine POU Oct6/Scip et Brn2, régule l'expression du facteur de transcription Krox20/Egr2 (les 2 noms sont attribués au même facteur de transcription) et dirige le passage du stade promyélinisant au stade myélinisant. Plus récemment, un deuxième circuit d'antagonisme croisé de Krox20 vis-à-vis de C-Jun et Sox2 a été décrit pour diriger une démyélinisation active après un traumatisme du nerf.

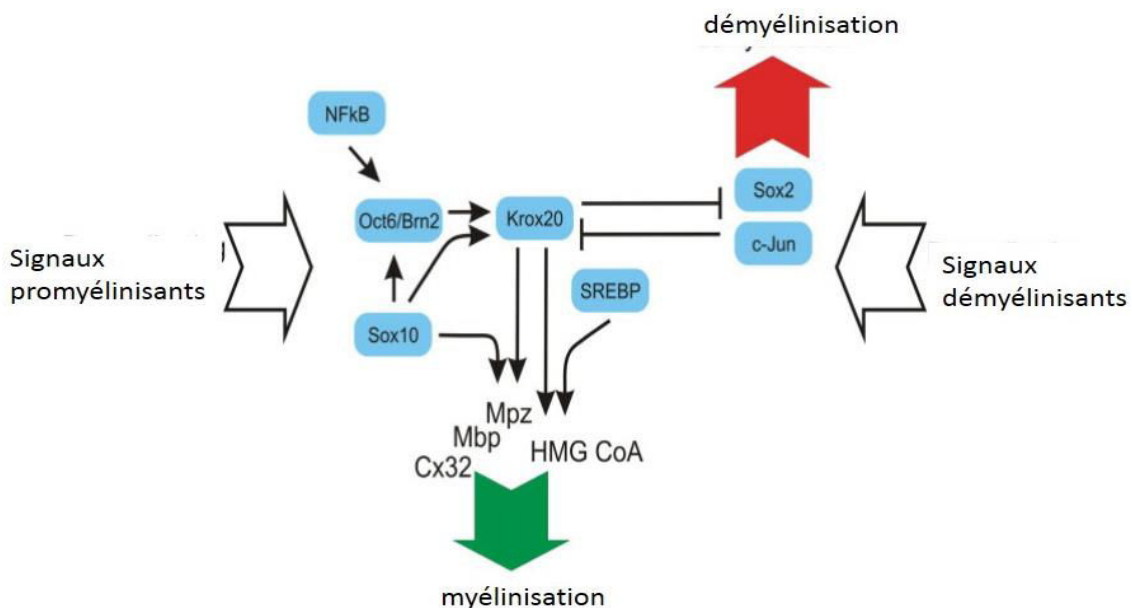


Figure 16: Grandes lignes d'un réseau de régulation de gènes de myéline associé à la différenciation des cellules de Schwann et les facteurs de transcription majeurs impliqués dans la transition du stade promyélinisant au stade myélinisant. Les flèches indiquent l'activation tandis que les lignes indiquent la répression. Ces voies de régulation présentent l'induction de plusieurs gènes dans les cellules de Schwann myélinisantes comme la MPZ, la MBP, la Cx32 et la HMG CoA réductase. (d'après Svaren et al., 2008).

Comme beaucoup de facteurs transcriptionnels, l'effet de Krox20 sur un certain nombre de gènes cibles est déterminé par son association avec des co-activateurs et des co-répresseurs. Krox20 est lié à l'histone p300 acetylase et le cofacteur HCF1 (Luciano et Wilson, 2003) et est identifié comme un composant du complexe contenant l'histone MLL H3K4 méthylases (Yokoyama et al., 2004). Cependant, un « screening » des protéines agissant avec Krox20 a identifié surtout des co-répresseurs comme la protéine Nab qui réprime la transcription médiée par EGR2 (Russo et al., 1995 ; Svaren et al., 1996, 1998). La ligase Sumo Piasx β est une protéine agissant comme un co-répresseur (Garcia-Dominguez et al., 2006) et le membre Ddx20 de la famille des ARN hélicases (Gillian et Svaren, 2004) bien que leurs fonctions dans les cellules de Schwann n'ont pas été explorées.

De ces co-facteurs, la preuve la plus répandue soutient un rôle essentiel des co-répresseurs Nab dans la régulation de l'expression des gènes de la myéline. Une des mutations d'EGR2 est associée à la neuropathie congénitale hypomyélinisante sévère (I268N, Warner et al., 1998) empêchant la liaison d'EGR2 aux protéines Nab (Warner et al., 1998).

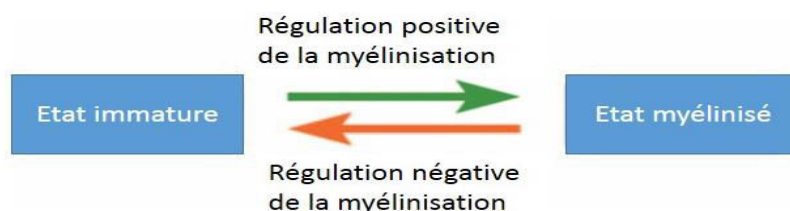


Figure 17: Régulateurs de la myélinisation : l'état myélinisé ou non myélinisé est déterminé par la balance opposant les systèmes de signalisation. Les régulateurs positifs dominent dans les nerfs normaux pendant que les régulateurs négatifs dominent dans les nerfs sectionnés ou en condition pathologique. Au cours du développement, les régulateurs négatifs peuvent

intervenir dans la programmation du début et le taux de myélinisation. (d'après Mirsky et al., 2008)

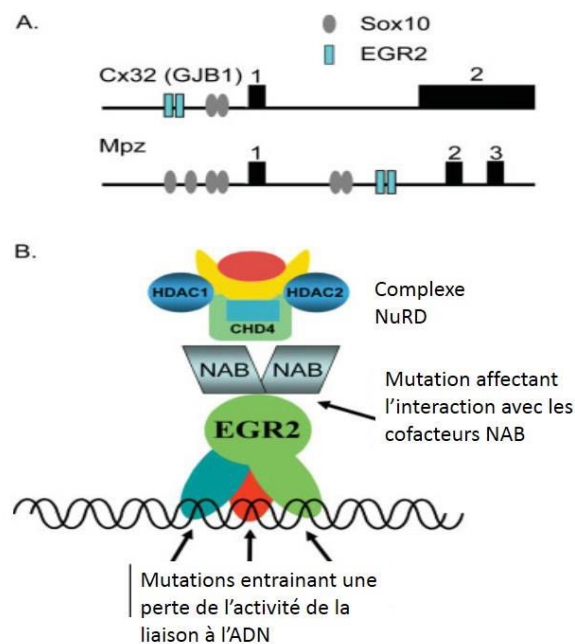


Figure 18: Sites fonctionnels de Krox20. Sur la figure (A), la configuration des sites de liaison de Krox20 au sein de la connexin 32 et le gène MPZ. Les éléments du promoteur de la connexin 32 et ceux des introns de MPZ sont activés par EGR2 et Sox10, et les configurations similaires des sites sont trouvées dans les gènes de MBP et de MAG. Sur la figureB, des mutations variées d'EGR2 associées à des neuropathies périphériques humaines. Pour des détails exacts, se referer à la base de données sur les mutations au cours des neuropathies périphériques héréditaires. (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>). (d'après Svaren et al., 2008). Les mutations dominantes ont été trouvées au sein des trois « zincs fingers » et altèrent généralement la liaison de l'ADN à EGR2. En plus, une mutation récessive dans le domaine de liaison de Nab a été identifiée dans une famille. La perte de la liaison de Nab peut permettre d'identifier la cible défectueuse du complexe de remodelage de la chromatine. L'importance des co-répresseurs Nab pour la régulation de la myélinisation du système nerveux périphérique par EGR2 a été confirmée par un double « knock out » des gènes Nab1/Nab2, ce qui donne un résultat très similaire à celui des souris déficientes en EGR2. Une létalité précoce et une neuropathie

périphérique sont le résultat d'un arrêt de la myélinisation (Le et al., 2005b). Bien que les co-répresseurs Nab puissent interagir avec d'autres régulateurs transcriptionnels, un récent « knock out » de l'analyse d'un allèle Nab résistant à Krox20 a confirmé l'importance de l'interaction des protéines Nab à Krox20 (Desmazieres et al., 2008). Les protéines Nab sont des répresseurs actifs quand elles sont recrutées pour des matrices transcriptionnelles (Svaren et al., 1998 ; Swirnof et al., 1998). Des analyses sur des délétions de Nab2 ont montré qu'il a deux domaines indépendants de répression, un de ses deux interagit avec la protéine CHD4 (Srinivasan et al., 2006). CHD4 est la sous-unité essentielle de NuRD du complexe « chromatin-remodeling ». L'analyse de l'expression de Nab suggère que les protéines Nab agissent aussi comme des inhibiteurs d'EGR2. En effet, la caractérisation des promoteurs Nab1 et 2 a permis d'identifier de multiples sites de liaison d'EGR2 (Le et al., 2005b) et des analyses récentes indiquent que les co-répresseurs Nab sont induits par Krox20 et d'autres facteurs de transcription neureguline dépendante (Le et al., 2005b ; Nagarajan et al., 2001 ; Srinivasan et al., 2007). Une perte de Nab1 est à l'origine d'une présence notable de surexpression des gènes myéliniques (Le et al., 2005b), des résultats similaires sont obtenus avec une suppression de l'allèle résistant de Nab à Krox20 (Desmazieres et al., 2008).

Des études récentes ont découvert un nombre de gènes qui seraient reprimés par EGR2 (directement ou indirectement) au cours du développement du système nerveux périphérique. L'expression d'EGR2 dans les cellules de Schwann est à l'origine d'une régulation négative du marqueur L1 des cellules de Schwann immatures (Parkinson et al., 2003), elle bloque aussi l'activité et l'expression de C-Jun (Parkinson et al., 2004, 2008). Des analyses de souris hypomorphes pour Krox20 ont montré que ce dernier régule négativement l'expression du facteur de transcription Sox2 (Le et al., 2005a) qui est généralement associé à une pluripotence et une maintenance du phénotype des cellules souches d'une variété de lignée cellulaire. Par ailleurs l'expression de Krox20 dans les cellules de Schwann réprime celui de Sox10 (Parkinson et al., 2008) ; l'induction de Sox2 et d'Oct6 a été aussi observé après une délétion induite de Krox20 dans les cellules de Schwann immatures (Decker et al., 2006). La répression de ces gènes requiert l'interaction des protéines Nab avec Krox20. Oct6, Sox2, Id2 sont régulés positivement en absence de la fonction de Nab (Desmazieres et al., 2008, Le et al., 2005b).

Chapitre II: Maintenance de la myeline peripherique/ Les regulateurs de la maintenance

I. La signalisation de ErbB2 dans les cellules de Schwann est indispensable pour la maintenance des nerfs périphériques myelinisés et la prolifération des cellules de Schwann après une lésion

Des lésions des nerfs périphériques sont à l'origine d'une sequence de changements distaux à la lésion connus sous le nom de degeneration Wallerienne (Griffin et Hoffman, 1993 ; Scherer et Salzer, 2001). Ils comprennent une degeneration axonal, une destruction de la myeline, une dedifferentiation et une prolifération des cellules de Schwann. Le phénotype moléculaire des cellules de schwann « denervées » des nerfs axotomisés est similaire aux cellules de schwann immatures en developpement (Jessen et Mirsky, 2005 ; Sherman et Brophy, 2005). Cependant, le contrôle de la prolifération est different. La prolifération des cellules de schwann est independant de la cyclin D1 en developpement mais la prolifération induite par la lesion est fortement lesé en absence de cyclin D1 (Kim et al., 2000 ; Atanasoski et al., 2001). Par ailleurs, l'inhibiteur p21 du cycle cellulaire regule la prolifération des cellules de Schwann en developpement et après lésion par differents mecanismes (Atanasoski et al., 2006). En caracterisant les signaux moléculaires qui contrôlent la reponse des cellules de Schwann à la lesion, ceci montre des implications pour notre compréhension des mecanismes de la maladie pour les neuropathies hereditaires et acquises (Suter et Scherer, 2003 ; Berger et Schaumburg, 1995).

Les cellules de Schwann expriment erbB2 et erbB3 formant des recepteurs heterodimeriques fonctionnels pour les neuregulines (Cohen et al., 1992Jin et al., 1993 ; Ho et al., 1995 ; Grinspan et al., 1996 ; Carroll et al., 1997 ; Vartanian et al., 1997). ErbB2 et ErbB3 sont des heterodimères obligatoires, parce que erbB2 seul ne peut pas se lier efficacement et erbB3 n'a pas d'activité kinase (Sliwkowski et al., 1994). Au cours du developpement, l'isoforme de la neureguline-1 a un fort effet sur la differenciation, la survie et la prolifération des cellules de Schwann (Shah et al., 1994 ; Dong et al., 1995 ; Morrissey et al., 1995 ; Grinspan et al., 1996 ; Trachtenberg et Thompson, 1996). Les animaux déficients en erbB2, erbB3 montrent un nombre reduit du nombre des précurseurs des cellules de Schwann ou des cellules de Schwann immatures (Riethmacher et al., 1997 ; Britsch et al., 1998 ; Wolpowitz et al., 2000). Une petite expression de la neureguline neuronale-1 ou ablation conditionnel de erbB2 dans les cellules de Schwann en developpement entrainent des defauts de la differenciation des cellules de Schwann postnatales et une formation anormale de la gaine de myeline (Garratt et al., 2000 ;

Chan et al., 2004 ; Michailov et al., 2004 ; Taveggia et al., 2005). Inversement, une surexpression de la neureguline-1 axonal chez des animaux transgéniques induit une hypermyélination (Michailov et al., 2004).

II. Sox10 est requis pour l'homeostasie des cellules de Schwann et la maintenance de la myéline dans les nerfs périphériques adultes

Le facteur de transcription Sox10 fonctionne au cours de multiples stades consécutives dans le développement des cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique. Bien que Sox10 continue d'être exprimé dans les cellules de Schwann matures du nerf périphérique adulte, il n'est actuellement pas montré s'il reste fonctionnel. Magdalena Bremer et ses collaborateurs ont utilisé une méthode génétique pour supprimer l'expression de Sox10 dans la glie par le moyen du tamoxifène. Les souris traitées par le tamoxifène ont développé une neuropathie périphérique sévère associée à des altérations dramatiques dans la structure et la fonction du nerf périphérique.

La démyélinisation et la dégénérescence axonale étaient aussi évidentes que les signes de neuroinflammation. Des altérations physiopathologiques sont présentes. Les cellules de Schwann ayant Sox10 supprimé persistent dans les nerfs périphériques mais ne peuvent pas devenir matures, le phénotype myélinisant montre que Sox10 est plutôt requis pour la différenciation et le maintien du stade différencié que pour la survie. Sox10 est surtout requis pour la fonction des cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique adulte et établit un modèle utile pour l'étude des neuropathies périphériques humaines.

A. L'ablation conditionnelle de Sox10 chez les souris adultes entraînent des symptômes neurologiques et des altérations dans la vitesse de conduction du nerf périphérique

Pour étudier les fonctions de Sox10, Magdalena Bremer et ses collaborateurs ont combiné l'allèle Sox10^{fl} (Finch et al., 2010) avec une transgène PLP ::CreERT2 (Leone et al., 2003) et traité une souris de 4 mois Sox10^{fl/fl} PLP ::CreERT2 pendant 5 jours consécutives avec de la tamoxifène. Les souris Sox10^{fl/fl} PLP ::CreERT2 traitées avec le tamoxifène ont été comparées aux souris Sox10^{fl/fl} PLP ::CreERT2 « mock-treated » et aux souris Sox10^{+/+} PLP ::CreERT2. Comme on ne peut pas distinguer les deux contrôles, il a été retenu comme contrôles les souris Sox10^{fl/fl} PLP ::CreERT2 « mock-treated ». Les souris traitées avec le tamoxifène ne présentent aucune anomalie phénotypique durant les quatre premières semaines. Cependant,

autour de « 30 dpi », les souris Sox10^{fl/fl} PLP::CreERT2 traitées avec le tamoxifène développent des symptômes neurologiques avec un pic à 39 dpi avant que les conditions ne s'améliorent. Au pic de la maladie, les souris traitées avec le tamoxifène présentent des membres postérieurs, des pattes retractées en arrière, une démarche instable et des frissons persistents. Les souris traitées avec le tamoxifène n'étaient pas leurs jambes. La résistance a été réduite de façon significative. Il y a un vieillissement marqué des souris traitées à la tamoxifène par rapport aux symptômes neurologiques.

B. L'ablation conditionnelle de sox10 chez des souris adultes entraine des alterations dans la structure du nerf périphérique

Aussi bien l'analyse macroscopique que celle des composés du potentiel d'action réalisée sur des altérations structurales sur les nerfs sciatiques traités au tamoxifène sur des souris Sox10^{fl/fl} PLP::CreERT2, Bremer et al., 2001 ont réalisé des analyses histologiques et morphologiques détaillées. A 7 ou 15 dpi, il n'y a pas de différences fondamentales sur les sections « semithin » entre les nerfs sciatiques des souris contrôles et ceux des souris Sox10^{fl/fl} PLP::CreERT2 traitées au tamoxifène. Ceci est corrélé avec l'absence d'altérations phénotypiques chez ses souris à ce moment. Par contre, le nombre de gaine de myéline est nettement réduit dans les nerfs sciatiques des souris Sox10^{fl/fl} PLP::CreERT2 traités au tamoxifène. Par comparaison aux nerfs contrôles, les nerfs provenant des animaux traités au tamoxifène avaient un aspect inégal avec quelques zones pratiquement dépourvues d'axones myélinisés tandis que d'autres présentaient une densité proche de la normale. On obtient les mêmes résultats lorsque les gaines de myéline sont mises en évidence à travers une immunohistochimie de la protéine MBP. De même, on remarque une réduction du nombre d'axones à travers une immunohistochimie de Tuj1. Parmi les axones qui seraient myélinisés en fonction de la taille de leur calibre, des axones de diamètre large apparaissaient surreprésentés dans les nerfs sciatiques des souris Sox10^{fl/fl} PLP : CreERT2 traitées au tamoxifène, ce qui est dû au fait qu'une fraction significative d'axones avait un diamètre au dessus de 2,5µm. Les gaines de myéline étaient absentes dans environ 20% des axones, qui devraient être myélinisés selon leur calibre au g ratio (rapport numérique entre le diamètre de l'axone et celui de la fibre myélinisée). L'épaisseur de la gaine de myéline des axones restants ne différait pas significativement de la situation dans les nerfs sciatiques des animaux non traités, et la répartition des g ratios était similaire entre les animaux traités au tamoxifène et les animaux non traités. Même lorsque les axones sont mis au contact des cellules en fonction de leur diamètre, les g ratios des différents groupes étaient comparables. Il en découle de ces analyses histologique et morphométrique qu'il ya moins d'axones

myélinisés chez les souris Sox10^{fl/fl} PLP:: CreERT2 traitées au tamoxifène et qu'il ya une grande fraction d'axones de gros calibre sans myéline. Un nombre substantiel d'axones reste encore normalement myélinisé. Par contre, des axones avec de la myéline mince n'étaient pas observés pour un nombre significatif. Cela est en faveur de l'absence de remyélinisation significative à ce stade. La présence continue de quelques axones normalement myélinisés était évidente à un niveau ultrastructural à la suite des études au microscope électronique. Etait également présent un changement ultrastructural global. Les nerfs sciatiques de souris non traitées présentaient des axones de gros calibre densément myélinisés avec des faisceaux de Remak intercalés, chacun consistant en une non-myélinisation par les cellules de Schwann associées à des axones de petits calibres tandis que les nerfs sciatiques siatiques des souris traitées au tamoxifène présentaient une diminution globale du nombre d'axones avec de la myéline souvent moins dense. Une fraction substantielle de ces myélines apparaît désorganisée et parfois une absence d'axone intact. Il y avait une présence significative de myéline fragmentée et de débris myéliniques. Un nombre considérable d'axones est entouré de cellules de Schwann contenant des quantités trop élevées de cytoplasme remplie de structures vésiculaires. Il y avait également la présence d'axones de gros calibre sans gaine de myéline pourtant entourés de cellules de Schwann. Rarement, il y avait des axones sans cellules de Schwann autour. L'analyse ultrastructurale confirme la présence de cellules de Schwann avec des propriétés modifiées, une démyélinisation, une dégénérescence axonale et une inflammation dans les nerfs sciatiques des souris Sox10^{fl/fl} PLP:: CreERT2.

III. Krox20 (Egr2) est indispensable pour la maintenance de la myéline périphérique

A. Sa mutation conditionnelle entraine une absence de myélinisation

Le modèle de souris pour la myélinisation défectueuse développés sur la base de deux mutants de Krox20 sont d'utilité limitée à cause de la courte durée de vie des animaux (Topilko et al., 1994 ; Le et al., 2005a). Cette létalité est probablement due à des défauts de l'activité de Krox20 dans d'autres tissus, particulièrement dans le tronc cérébral où l'inactivation de Krox20 entraine une perturbation du rythme respiratoire (Jacquin et al., 1996 ; Chatonnet et al., 2002). Pour contourner ce problème, Decker et al., 2006 ont généré une mutation ne permettant que la seule transitoire expression de Krox20. Une telle mutation peut ne pas affecter considérablement les tissus dans lesquels le gène est normalement exprimé transitoirement comme le « hinbrain ». En revanche, si l'expression de Krox20 est constamment requise pour

la myélinisation des cellules de Schwann, ce type de mutation entrainerait un phénotype similaire à celle de « nul mutation ». Pour obtenir une mutation retardée, ils ont utilisé deux allèles de Krox20 précédemment développés, Krox20^{Cre} (Voiculescu et al., 2000) et Krox20^{flox} (Taillebourg et al., 2002). L'allèle Krox20^{Cre} consiste en l'insertion du gène de la Cre recombinase dans le locus Krox20 entraînant une inactivation de Krox20 et l'expression du gène Cre avec un modèle qui recapitule fidèlement le rythme normal de Krox20 (Voiculescu et al., 2000). Dans l'allèle Krox20^{flox}, le deuxième exon de Krox20 est flanqué par les sites loxP. Cet allèle se comporte comme le type sauvage mais l'excision de l'exon floxé par la recombinase Cre entraîne une inactivation de Krox20 (Taillebourg et al., 2002).

Dans les cellules de Schwann myelinisantes provenant d'animaux hétérozygotes Krox20^{Cre/flox}, Krox20 devrait être exprimé à partir de l'allèle floxé jusqu'à ce que la recombinase Cre s'accumule suffisamment pour conduire à l'inactivation du gène. En suivant l'excision de l'exon floxé par analyse PCR de l'ADN extrait d'échantillon de nerf postnatal1 (P1), P4 et P28 a montré que l'excision avait déjà été initiée à P1 et a progressé avec le temps affectant plus de la moitié des cellules à P4 bien qu'il n'atteint pas l'exhaustivité à P28. Il en résulte probablement de la présence de cellules de Schwann non myelinisantes et d'autres cellules comme les fibroblastes qui n'expriment pas Krox20. L'inactivation du gène dans des cellules de Schwann est corrélée avec une perte progressive de la protéine Krox20.

Les animaux Krox20^{Cre/flox} survivent jusqu'à six 6 semaines. Ils sont tous plus petits que les contrôles (type sauvage Krox20^{Cre/+}, Krox20^{flox/+}) avec une réduction du poids corporel de l'ordre de 25 à 50%. En plus, les mutants Krox20^{Cre/flox} affichaient un phénotype spécifique impliquant des frissons et une altération de la coordination de la marche. Chez les animaux mutants d'âge compris entre 4 et 6 semaines, l'examen des semi fines du nerf sciatique et l'analyse électromicroscopique a révélé une absence complète de la gaine de myéline malgré une densité normale axonale. Aucune infiltration de macrophage ou de bulbe d'oignon de cellules de Schwann n'était observée mais un développement extensif, concentrique des membranes basales était fréquemment trouvé autour des axones. En plus, le cytoplasme axonal des mutants contenait une densité élevée de mitochondrie, de microtubules et de neurofilaments par rapport aux contrôles, suggérant que le déficit de la myéline a entraîné des perturbations axonales.

Les analyses démontrent que les nerfs des mutants Krox20^{Cre/flox} ne sont pas myélinisés chez les adultes et pose la question à savoir si une myélinisation a-t-elle lieu au cours du développement postnatal. Pour répondre à cette question, des sections de nerf sciatique à P4 ont été analysées en microscopie électronique. Les animaux de type sauvage présentent beaucoup

de myéline fine alors que les mutants $Krox20^{Cre/flox}$ sont presque complètement amyéliniques. Les tentatives de myélinisation ont été suggérées par l'observation des axones dénudés aux mesaxones initiant le processus d'enroulement mais seulement peu de fibres de myéline généralement pas bien compactées auraient été observé chez les mutants. Une analyse similaire réalisée sur des P12 a révélé une absence complète de gaine de myéline. Ces résultats suggèrent que l'initiation de la myélinisation a très rarement lieu chez les mutants mais s'il a lieu, un processus d'avortement de myélinisation suit.

Il existe une contradiction apparente entre la cinétique de mise en place de bloc de la myélinisation des cellules de Schwann et la perte partielle de l'allèle floxé et la protéine Krox20 avec seulement presque une double réduction à P4. Une possible explication est que la persistance de l'allèle floxé non excisé est causée par une prolifération intense au cours de la période périnatale des cellules de Schwann immatures qui n'ont pas encore activé Krox20. Une proportion significative de ces cellules peut en permanence tenter de s'engager dans la myélinisation, exprimant Krox20 et donc de maintenir un certain niveau de protéine dans le nerf. Cependant, ces cellules qui rapidement inactivent le gène ne sont pas capables de procéder à une entrée dans la voie de la myélinisation.

Ces résultats indiquent que l'inactivation retardée de Krox20 entraînent une amyélinisation périphérique et que ce phénotype est maintenu à partir de la naissance jusqu'à au moins six semaines, suggérant que l'inactivation de Krox20 empêche définitivement la myélinisation contrairement au « knock-out » SCIP/Oct6 (Jaegle et al., 1996).

B. Krox20 est requis pour la maintenance de la myéline périphérique

Les résultats obtenus à partir des mutants $Krox20^{Cre/flox}$ n'ont pas abordé la question de savoir si Krox20 serait requis seulement au cours de l'initiation du processus de myélinisation et pourrait être indispensable dans les étapes ultérieures. Pour étudier cette possibilité, Decker et al., 2006 ont utilisé l'allèle floxé pour développer un autre mutant conditionnel. Ils ont généré des mutants hétérozygotes portant l'allèle floxé et l'allèle $Krox20^{lacZ}$ qui est nul en termes d'activité Krox20 (Schneider-Maunoury et al., 1993) ainsi que le transgène $R26-CreER^T$. Celui-ci se compose en un $CreER^T$ (TM-inducible Cre recombinase) exprimé à partir du locus Rosa26 ubiquitaire (Vooijs et al., 2001). Les animaux $Krox20^{lacZ/flox}$, $R26-CreER^T$ ont été premièrement analysé dans un protocole systémique d'administration TM. Des animaux de trois mois d'âge ont reçu une injection intraperitonéale de TM et sacrifiés 28 jours après la dernière injection.

L'analyse de l'ADN du nerf sciatique a révélé une excision partielle du second exon de *Krox20* qui est corrélé à un niveau bas de la protéine de Krox20. Les animaux *Krox20^{lacZ/flox}*, *R26-CreER^T* affichaient des signes cliniques discrets à partir de 5 à 7 jours après la dernière injection. Ils avaient une patte retractée et étaient plus statiques que les contrôles. L'observation des sections semi fines de nerf sciatique d'animaux sacrifiés indiquaient une densité normale des axones myélinisés. Cependant, la microscopie électronique a révélé une présence de groupes de 2 à 3 axones sans gaine de myéline distincte des axones de faible calibre non myélinisé qui étaient préservés. En plus, certains nœuds de Ranvier étaient élargis et des macrophages chargés de débris de myéline étaient observés dans l'espace endoneural. Cette invasion macrophagique était associée à une accumulation de couches concentriques de la membrane de cellules de Schwann. Des tentatives de remyélinisation ont été observées dans les axones dénudés associés aux mesaxones initiant le processus d'enroulement et des gaines de myéline anormalement minces par rapport au calibre de l'axone. Toutes ces caractéristiques n'ont pas été observées chez les animaux témoins. A cause du phénotype histologique relativement discrète, ils ont trouvé que leur protocole n'était pas vraiment approprié pour donner un modèle utile pour des études supplémentaires. La répétition (2 fois) de l'injection de TM n'a pas radicalement changé la situation bien qu'il ait augmentée la sévérité des signes cliniques et a entraîné une présence de groupes larges d'axones sans myéline. Ils ont soutenu l'idée que la faible fréquence de la différenciation des cellules de Schwann a été probablement causé par l'excision inefficace du second exon de *Krox20*, lui-même résultant de la faible accès de l'injection intrapéritonéale de TM aux cellules de Schwann à l'intérieur du nerf (Leone et al., 2003). Ils ont donc décidé de réaliser des injections directes d'OHT « a water derivative of TM dans le nerf sciatique. Les animaux ont reçu une injection d'OHT dans une des pattes avec une injection du vecteur dans l'autre patte et sacrifiés 3,8 et 28 jours après injection. Ceci a entraîné des signes cliniques plus sévères que le protocole d'injection péritonéale de 5 jours avec systématiquement des pattes retractées et faibles correspondant à la jambe injecté avec l'OHT et une posture de marche déséquilibrée. Dès 3 jours après l'injection, l'analyse électromicroscopique du nerf sciatique injecté avec l'OHT a révélé que la zone d'injection a été soumise à une dégradation de la myéline avec certains axones déjà dénudés. Ces observations étaient compatibles avec les analyses d'immunofluorescence indiquant la perte corrélée de Krox20 et de la protéine de myéline MBP dans les zones du point d'injection. Aucun de ces phénotypes n'étaient observé sur le côté injecté avec le vecteur ou chez les animaux témoins. Huit jours après l'injection, la déplétion de la myéline était sévère avec l'observation de régions pratiquement dépourvues de myéline par rapport aux contrôles injectés

avec le vecteur. La présence de macrophages et d'une myéline particulière a montré que c'est une myéline activement dégradée. Vingt huit (28) jours après l'injection, le niveau d'infiltration macrophagique a été réduit, aucun signe d'axonopathie n'a été détecté mais des formations de bulbes d'oignons ont été observées et de nombreux axones restent dénudés indiquant que la démyélinisation est de longue durée et éventuellement permanente. En plus, la présence des nombreux enroulements de mesaxones autour des axones et des axones avec de fines gaines de myéline anormaux a suggéré que les tentatives de remyélinisation ont eu lieu au même moment. L'analyse de l'ADN du nerf sciatique a montré que les phénotypes cliniques et histologiques corrélés à une excision partielle du second exon de *Krox20* et des niveaux réduits de la protéine *Krox20* qui étaient observés dès 3 jours après l'injection. En plus, il a été montré que l'excision a été observée à au moins 5 mm du site d'injection d'OHT suggérant que le composé peut diffuser efficacement le long du nerf.

En conclusion, toutes leurs observations ont établi que *Krox20* est constamment requis pour la maintenance de la gaine de myéline et que son inactivation entraîne une démyélinisation rapide suivie par des tentatives de remyélinisation.

C. Le KO conditionnel de *Krox20* entraîne une accumulation des cellules de Schwann immatures et une augmentation de la prolifération

Parce que l'inactivation focal de *Krox20* entraîne une démyélinisation, Decker et al., 2006 ont analysé les conséquences au niveau cellulaire, sur l'expression des gènes de cellules de Schwann et la prolifération. Pour évaluer l'état de différenciation des cellules de Schwann, ils ont analysé l'expression de Sox2, Scip et Oct6 par immunofluorescence. Sox2 est un marqueur des cellules de Schwann immatures alors que Scip est exprimé au début de la myélinisation par les cellules de Schwann pro-myélinisantes et myélinisantes et les deux marqueurs sont faiblement exprimés par les cellules de Schwann matures (Blanchard et al., 1996 ; Jaegle et al., 1996 ; Le et al., 2005a). Considérant que l'injection de DMSO seul dans les nerfs sciatiques *Krox20^{lacZ/flox}*, R26-CreER^T n'a pas entraîné de modifications de l'expression de Sox2 et de Scip ($5 \pm 1\%$ des cellules de Schwann étaient Sox2 – Scip positives à 3 jours, aucune variation significative de ces proportions n'a été observée à 8 et 28 jours après l'injection). L'injection d'OHT a abouti à l'accumulation de deux protéines. Cependant, les cinétiques étaient différentes. Sox2 était rapidement induit par OHT avec $42,3 \pm 9,6\%$ de cellules positives à 3 jours après l'injection et retourne progressivement à un niveau basal avec $21,2 \pm 7\%$ de cellules positives à 8 jours après et $5,7 \pm 3\%$ après 28 jours. En revanche, l'augmentation du niveau de

protéine Scip en réponse à l'injection d'OHT a été plus lente. Il a été seulement légèrement plus élevé à 3 jours après l'injection d'OHT mais il a atteint un niveau élevé à 8 jours après l'injection ($34 \pm 10\%$) qui a été maintenu pendant au moins 28 jours ($37,4 \pm 6,8\%$). Ces modifications de l'expression de Sox2 et de Scip ont également été observées jusqu'à au moins 5 mm du site d'injection d'OHT, conformément aux données après délétion du second exon de Krox20. En définitive, ces résultats suggèrent que les cellules de Schwann qui ont perdu Krox20 adoptent l'identité des cellules de Schwann immatures et ensuite tentent de se réengager dans le processus de myélinisation. Afin de déterminer si ces changements de la différenciation des cellules de Schwann ont été accompagnés par des modifications du taux de prolifération cellulaire, les auteurs ont estimé la proportion des cellules en phase S par incorporation de BrdU. Etant donné que les contrôles et les nerfs sciatiques injectés avec le DMSO contenaient un pourcentage faible de cellules en phase S, ce pourcentage dépasse les 10% dans le cas d'injection d'OHT. Ce pourcentage diminue ensuite progressivement pour atteindre le niveau des contrôles à 28 jours suivants l'injection d'OHT. Ces données suggèrent que l'injection d'OHT dans les nerfs Krox20^{lacZ/flox}, R26-CreER^T dans un état transitoire de prolifération cellulaire, parallèle à l'élévation de l'expression de Sox2. Par conséquent, la démyélinisation induite par KO conditionnelle de Krox20 semble être accompagnée de l'apparition fortuite de cellules de Schwann immatures et la réactivation de la prolifération cellulaire.

IV. LES NERFS PERIPHERIQUES

A. Le nerf normal

1. Organisation générale du nerf périphérique

A l'état adulte, les fibres nerveuses constituées d'axones et de cellules de Schwann qui y sont associées, sont regroupées en fascicules, engainés par le péricyèvre. Ce dernier est constitué de couches de cellules périneurales, d'origine fibroblastique, séparées par des faisceaux de collagène et liées entre elles par des jonctions serrées. Les fibres nerveuses sont associées aux cellules de Schwann, seules cellules gliales du système nerveux périphérique. Celles-ci jouent

un rôle primordial dans la maintenance axonale, la myélinisation et les processus de régénération. Les fascicules nerveux sont contenus dans un tissu conjonctif aréolaire appelé épinèvre contenant des fibroblastes, du collagène et de la graisse, en proportions variables. Cette enveloppe participe à la fixation et au glissement du nerf au sein des structures environnantes. Elle contient le réseau lymphatique et vasculaire qui traverse le périnèvre pour communiquer avec le réseau d'artérioles et veinules de l'endonèvre. L'épinèvre constitue 30 à 70% de la surface totale de section d'un tronc nerveux (Fig18).

Un nerf peut être constitué d'un à une centaine de fascicules dont le nombre et la distribution sont constamment variables, grâce à un grand nombre d'échanges de rameaux anastomotiques. De même, à un niveau macroscopique, les anastomoses entre nerfs différents sont fréquentes, par exemple entre les nerfs ulnaires et médians (anastomose de Millard-Gübler).

Il possède un certain degré de résistance à l'étirement, assuré par le double jeu de l'architecture « ondulante » des fascicules et des fibres nerveuses qu'il contient, enfin grâce aussi à l'élasticité du périnèvre. L'homéostasie de ce micro-environnement est obtenue et maintenue par un système vasculaire complexe et par la barrière active que constitue le périnèvre. On retrouve comme dans le système nerveux central, une véritable barrière hémato-nerveuse dont l'étanchéité est liée aux propriétés du périnèvre et à la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales capillaires pénétrant dans l'endonèvre et les cellules du périnèvre.

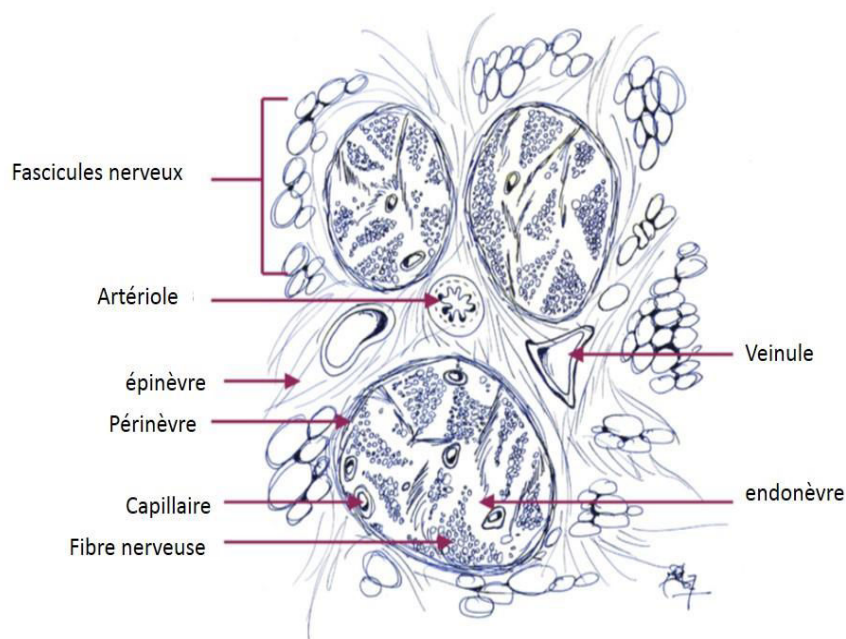


Figure 19. Coupe axiale d'un nerf périphérique (d'après P. Rigoard).

2. Structure et physiologie de l'axone

L'axone est le prolongement cylindrique du cytoplasme du neurone. Son rôle principal est la transmission de l'influx nerveux. Il ne se conçoit que dans le contexte d'une unité fonctionnelle entre le neurone et sa cible. Etant dépourvu de capacités de synthèse protéique propre, ses constituants sont donc acheminés du noyau vers la périphérie par le flux axonal.

Le cytosquelette axonal possède une structure microfibrillaire constituée de trois principaux groupes de protéines : les microfilaments, les microtubules et les filaments intermédiaires comprenant les neurofilaments. Elles contribuent au maintien de la forme et à la croissance de l'axone. Les neurofilaments sont constitués par un assemblage de trois protéines qui s'écartent au cours d'un processus de phosphorylation, ce qui leur confère un rôle fondamental dans la détermination du diamètre axonal. Celui-ci est corrélé à la myélinisation, il s'agit donc d'un paramètre structural essentiel. Les microfilaments, constitués d'un assemblage de polymères d'actine globulaire, se localisent préférentiellement dans les zones en mouvement et au niveau des ancrages membranaires jouant un rôle significatif dans la mobilité du cône de croissance axonal et dans la synaptogénèse. Les microtubules, hétérodimères des tubulines alpha et bêta forment des tubules creux sur lesquels se fixent de nombreuses autres protéines impliquées dans l'assemblage, la stabilisation et les interactions avec le reste du cytosquelette. Ces microtubules participent à la croissance et au flux axonal.

Le flux axonal circule constamment à double sens antérograde et rétrograde et ce, à des vitesses variables en fonction des éléments transportés. Il assure en permanence la communication entre neurones, terminaisons axonales et cellules cibles. Il se divise en deux voies rapides antéro- et rétrograde, une voie lente antérograde et une voie réservée aux mitochondries. Le flux antérograde rapide transporte d'une part des structures vésiculaires et tubulaires contenant les précurseurs des neurotransmetteurs, des protéines membranaires et d'autre part, des mitochondries et des lipides membranaires. Le flux antérograde lent transporte quant à lui, les protéines de structure du cytosquelette et des macromolécules. Le flux rétrograde rapide ramène les déchets cellulaires, achemine des enzymes, des facteurs de croissance et des vésicules lysosomiales, participe au rétrocontrôle de l'activité du corps cellulaire par la cible. Ce sont les microtubules qui permettent ce transport grâce à l'aide de protéines motrices : principalement la kinesine (pour le flux antérograde) et la dynéine (pour le flux rétrograde).

Lorsqu'il s'agit d'un neurone moteur périphérique, c'est la synapse neuromusculaire qui correspond à l'extrémité terminale de l'axone entrant en relation avec sa cible. A ce niveau, le signal électrique est transformé en signal chimique. L'arrivée de l'influx provoque l'entrée de calcium par l'ouverture de canaux calciques voltage dépendants, déclenchant ainsi une cascade d'activation intracellulaire qui aboutit à la fusion de la membrane et des vésicules synaptiques contenant les neurotransmetteurs, ainsi libérés par exocytose dans la fente synaptique.

3. Jonction neuromusculaire et transmission neuromusculaire

Le système musculosquelettique est l'intermédiaire mécanique par lequel notre système nerveux interagit avec le monde extérieur. Les propriétés mécaniques des muscles ont été très largement préservées au cours de la phylogénèse des vertébrés et ces propriétés ont été initialement déterminantes pour adapter les mécanismes neuronaux du mouvement.

Un simple motoneurone est bombardé d'inputs synaptiques dont la résultante détermine finalement de quelle manière et avec quelle intensité la fibre musculaire cible va participer à la réalisation d'un programme moteur. Cette réponse de la cellule nerveuse à un stimulus est permise par une modification de ses propriétés membranaires. La synapse neuromusculaire est la zone de jonction entre l'axone d'un motoneurone et une cellule musculaire. Chez les mammifères (à des rares exceptions près), il n'y a pas de contact véritable au niveau synaptique. L'espace synaptique (10 à 40 nanomètres) séparant les cellules sert « d'isolateur ».

Cette jonction neuromusculaire (Fig19) est constituée par l'apposition de domaines hautement différenciés de trois types de cellules : la terminaison nerveuse du motoneurone, la cellule de Schwann dite terminale et la membrane post-synaptique de la fibre musculaire. Ces trois constituants sont entourés ou reliés par une lame basale, micro-environnement propice à l'échange des signaux moléculaires qui contrôlent la formation, la maturation et la maintenance de la jonction neuromusculaire. La jonction neuromusculaire forme un complexe fonctionnellement et structurellement différencié dont le but est d'assurer la transmission synaptique au sein de l'appareil neuromusculaire, en permettant la propagation de l'influx du neurone moteur vers la fibre musculaire squelettique.

La terminaison nerveuse libère un neurotransmetteur dans l'espace synaptique, l'ACh qui se lie à des récepteurs nicotiniques spécifiques (les récepteurs de l'acétylcholine [RACH]),

localisés au niveau des crêtes des invaginations ou plis sous-neuraux de la membrane post-synaptique de la fibre musculaire.

L'activation de ces récepteurs provoque une dépolarisation de la membrane musculaire ou potentielle de plaque entraînant une cascade de réactions appelée couplage excitation-contraction (CEC) induisant in fine la contraction de la fibre musculaire adjacente. De multiples outils ont été développés pour caractériser de façon simple l'aspect morphologique de la jonction neuromusculaire normale et les anomalies qui découlent de modifications pathologiques de ces jonctions. L'avènement de la biologie moléculaire a permis la découverte d'un grand nombre de molécules synaptiques concentrées à la jonction et a donc favorisé la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués d'une part, dans les phénomènes de dénervation et de réinnervation puis d'autre part, dans les phénomènes neuromusculaires, et en particulier les syndromes myasthéniques congénitaux formant un groupe hétérogène d'affections d'origine génétique qui conduisent à un dysfonctionnement de la transmission neuromusculaire. Leur caractérisation repose sur la mise en évidence d'anomalies structurales de la jonction neuromusculaire, de mutations dans les gènes codant pour des protéines concentrées au niveau des plaques motrices et sur les mécanismes moléculaires par lesquels de telles mutations induisent la maladie.

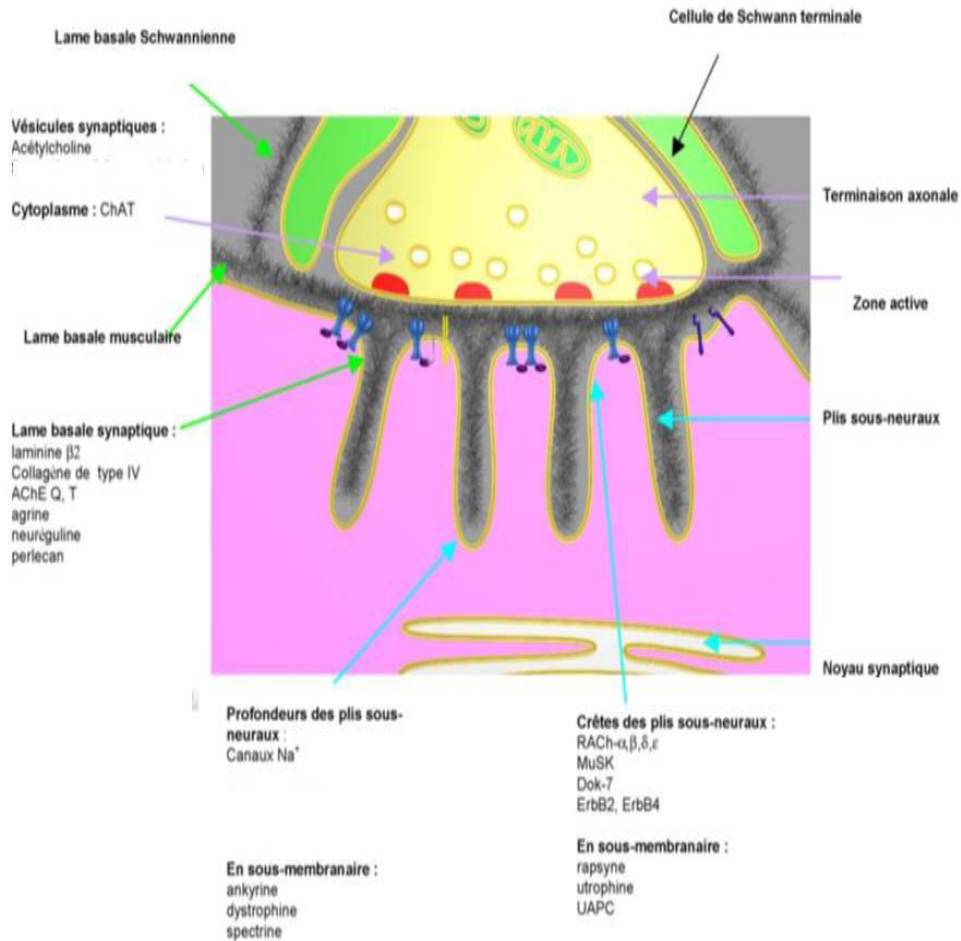


Figure 20 Représentation schématique de l'agencement moléculaire de certaines protéines concentrées à la jonction neuromusculaire (d'après Sanes et Lichtman, 1999).

4. Le phénomène de la contraction musculaire

Le muscle squelettique de l'adulte est un tissu spécialisé, composé de plusieurs types de fibres musculaires. Les fibres, toutes multinuclées et striées, se distinguent les unes des autres par leur vitesse de contraction (rapide ou lente) et leur contenu en protéines contractiles.

L'action des fibres musculaires est le fait d'une véritable « machinerie contractile » associée à des composants non contractiles leur assurant une stabilité mécanique.

La myofibrille, sous-entité morphologique de la fibre musculaire, possède une architecture extrêmement constante, faites d'unités cylindriques longitudinales, appelées sarcomères.

Le sarcomère est quant à lui, l'unité fonctionnelle de longueur des muscles squelettiques, haut lieu de la transduction chimique du signal en énergie mécanique contractile, sous la médiation du calcium essentiellement.

Le reticulum sarcoplasmique (RS) est l'autre constituant clé de la fibre musculaire. Il s'agit d'un réticulum endoplasmique lisse hautement spécialisé au sein des cellules musculaires. Son volume varie entre 1,5 et 10% de celui de la fibre musculaire en fonction de l'espèce animale et du type histochimique de la fibre (le volume des myofibrilles occupant environ 80% du volume de la fibre musculaire).

Au sein de la cellule musculaire squelettique, le reticulum sarcoplasmique forme un réseau intriqué de canalicules et de saccules anastomosés entre eux, interagissant étroitement avec les myofibrilles. Il est composé de citernes légèrement dilatées (citernes terminales) en continuité avec un réseau de tubules longitudinaux (reticulum sarcoplasmique longitudinal). Dans le muscle squelettique mature, deux citernes terminales sont placées de chaque côté d'un tubule transverse (tubule-T) issu de l'invagination du sarcolemme de la fibre musculaire et l'ensemble forme une unité fonctionnelle, véritable synapse intracellulaire, caractéristique de la fibre musculaire squelettique.

Il est chargé de contrôler la sequestration, le relargage et la distribution du calcium à la fibre, sous l'influence de la propagation du potentiel d'action. Ce sont principalement les récepteurs à la ryanodine et aux dihydropyridines qui interviennent dans les échanges de calcium au sein du réticulum sarcoplasmique.

La contraction musculaire s'explique par le glissement des myofilaments les uns sur les autres. Ce glissement de myofilaments entre eux est lié à une interaction cyclique qui s'établit entre les molécules d'actine et de myosine en impliquant l'intervention d'ions calcium et d'ATP (Fig20). A l'état de repos musculaire, les ions calcium se trouvent à des concentrations peu élevées dans le sarcoplasme et à des concentrations élevées dans le reticulum sarcoplasmique. En absence de calcium, les sites d'attachement des molécules d'actine à la myosine sont partiellement cachés par les molécules de tropomyosine (Fig. 20A). Lors de la contraction musculaire, les modifications structurales sous jacentes impliquant la fixation de la myosine sur des sites spécifiques de l'actine, sont sous la dépendance d'ions calcium.

Sous l'influence de l'influx nerveux véhiculé par le motoneurone périphérique, la membrane plasmique de la fibre musculaire est dépolarisée et cette excitation est transmise le long des tubules transverses pour atteindre les triades. Il s'ensuit une dépolarisation du réticulum sarcoplasmique, qui est à l'origine de la libération d'ions calcium dans l'espace myofibrillaire par les récepteurs de la RyR. Le calcium se fixe alors sur les molécules de troponine (Fig20B),

provoquant ainsi un déplacement des molécules de tropomyosine vers le fond de la gouttière formée entre les deux brins torsadés d'actine, déplacement qui démasque, sur l'actine, les sites de fixation de la myosine. Dès lors, la tête de la myosine, préalablement chargée en ATP, peut se fixer sur le site de l'actine rendue accessible et cet attachement s'accompagne d'une plicature de la molécule de myosine (Fig.20C). Puis, l'ATP est hydrolysée par l'activité ATPasique de la myosine pour donner de l'ADP plus du phosphate inorganique (Fig.20D) et fournir ainsi l'énergie nécessaire au pivotement de la tête de myosine, qui assure le glissement du filament fin vers le centre du sarcomère. La fixation d'une nouvelle molécule d'ATP sur la tête de myosine permettra la libération de l'actine et le début d'un nouveau cycle (Fig.20E). La répétition et la multiplication de ces cycles en fonction du nombre des molécules d'actine et de myosine seront à la base de la contraction musculaire. En l'absence de fixation d'une nouvelle molécule d'ATP sur la tête de myosine, les molécules de myosine et d'actine resteront liées l'une à l'autre et la décontraction musculaire ne pourra se faire, c'est notamment ce qui survient lors de la rigidité cadavérique. Les filaments associés au sarcomère interviennent dans le maintien de sa stabilité. Ainsi, la titine s'oppose aux forces contractiles produites par les filaments de myosine, leur permettant de rester centrés sur le sarcomère ; la nébuline, qui ajuste la longueur des filaments d'actine, maintiendrait leur cohésion pendant la contraction musculaire ; les filaments de desmine, qui entoure la strie Z, sont étroitement unis au sarcolemme par la synémine au niveau de la strie Z et par la skélémine au niveau de la bande M, ce qui permet au muscle de maintenir son architecture régulière.

Le relâchement musculaire est lié à l'arrêt de l'hydrolyse de l'ATP et à la diminution de la concentration du calcium dans le cytosol. Au cours de cette phase, les filaments fins glissent en sens inverse, sortent de la bande A, si bien que la bande I s'élargit et que la bande H réapparaît. Le déplacement des filaments fins, purement passif, est lié à l'action des fibres musculaires antagonistes qui tirent sur les fibres préalablement contractées, provoquant ainsi l'allongement des sarcomères raccourcis au cours de la contraction et permet par voie de conséquence leur relaxation.

Pour que la relaxation se maintienne, le taux de calcium cytosolique doit revenir à son niveau de base ; pour ce faire, il est réabsorbé grâce aux Ca^{2+} -ATPases, pour être à nouveau stocké dans le reticulum sarcoplasmique. Dès lors, les ions calcium quittent la troponine, ce qui induit le déplacement de la tropomyosine, masquant, à nouveau partiellement, le site de fixation de la myosine à l'actine. Le libre déplacement des filaments fins et épais les uns par rapport aux autres est alors permis.

Parallèlement, l'ATP doit être régénérée à partir de l'ADP et pour cela, trois voies sont possibles. Deux voies impliquent une réaction de transphosphorylation catalysée, soit par la myokinase soit par la créatine kinase ; la troisième implique la phosphorylation oxydative qui a lieu dans les mitochondries.

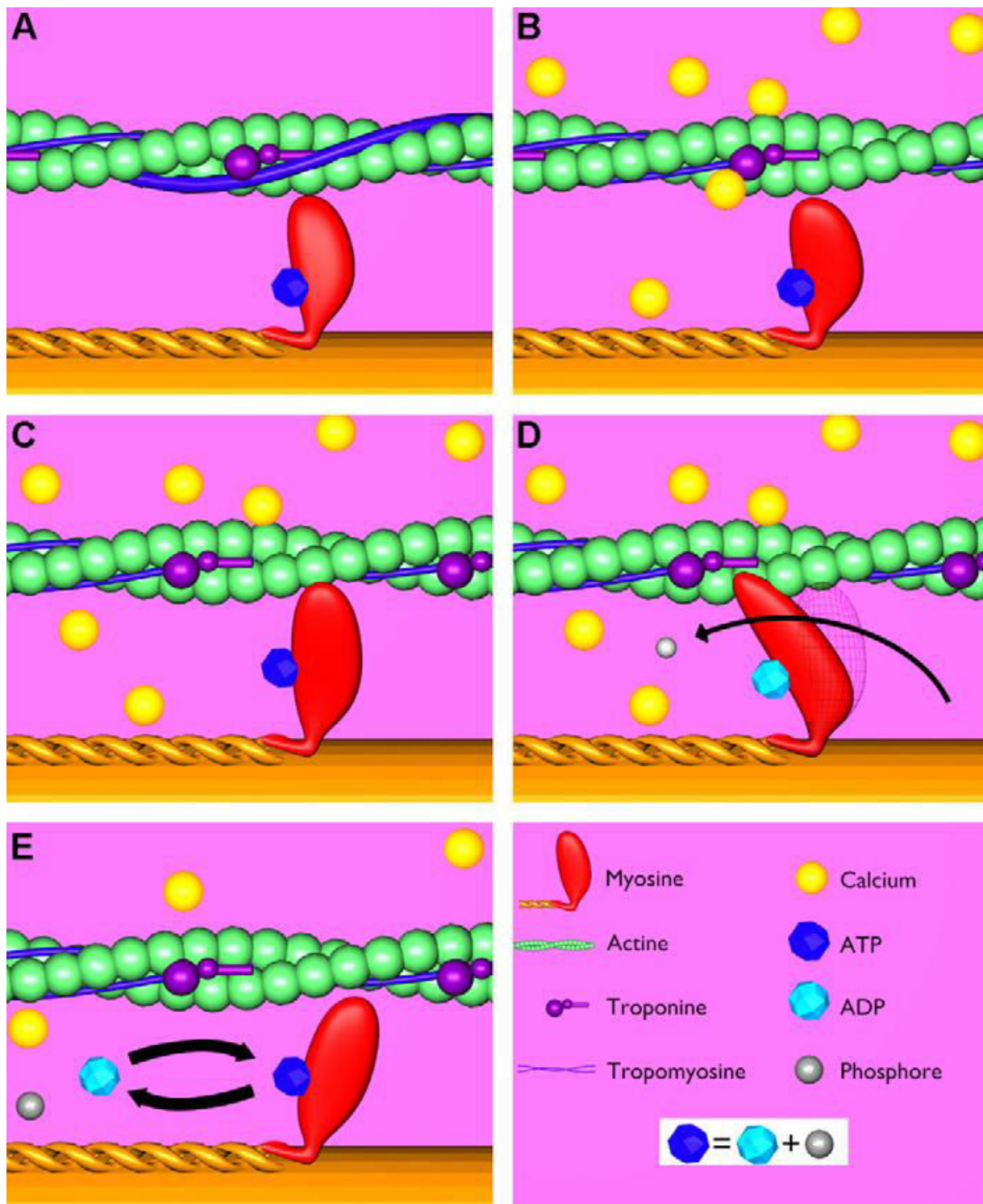


Figure 21 Lorsqu'une molécule d'ATP se fixe à la myosine, elle entraîne l'ouverture du site de fixation à l'actine, permettant le détachement de la tête de myosine du filament d'actine. (d'après P. Rigoard et al., 2009)

5. Mécanisme de formation synaptique

La formation synaptique est un processus indispensable lors du développement neuronal permettant la communication entre deux neurones. Une des caractéristiques principales du développement du système nerveux est la spécificité des connexions. Ainsi, la migration des axones vers leurs cibles et la formation de synapses sont des processus sélectifs, faisant intervenir de nombreuses molécules de reconnaissance, dont la plupart reste inconnue.

La synthèse et la distribution des récepteurs de l'acétylcholine au niveau de la membrane post-synaptique de la jonction neuromusculaire paraissent en effet régulées par des signaux antérogrades provenant du motoneurone. La différenciation de la terminaison axonale est, quant à elle, également régulée par des signaux rétrogrades. Le nerf et le muscle ont des rôles distincts dans la différenciation du compartiment synaptique. Les étapes initiales de cette différenciation et la formation de la plaque motrice requièrent plusieurs agents moléculaires post-synaptiques dont le récepteur tyrosine kinase à l'agrine, MuSK et la rapsyne. La croissance axonale et la maintenance de l'appareil post-synaptique dépendent surtout de l'agrine neuronale et d'un signal spécifique émanant de la fibre nerveuse, chargé de disperser les reliquats d'agrégats de récepteur d'acétylcholine ectopiques, tout cela étant possiblement médié par l'acétylcholine elle-même. La neuréguline intervient essentiellement dans le maintien de la cellule de Schwann, qui guide la croissance axonale. La formation synaptique du système nerveux central présente en fait de nombreuses similitudes avec le développement de l'innervation motrice. Cela permet l'étude de certains mécanismes de restauration de la connectique nerveuse, succédant à une lésion nerveuse traumatique ou dégénérative et ainsi d'envisager l'émergence de nouvelles thérapies qui pourraient favoriser la récupération sur un plan fonctionnel.

On distingue trois étapes fondamentales dans la formation synaptique :

- La création d'une connexion entre l'axone en croissance et sa cellule cible ;
- La différenciation des cônes de croissance axonaux en une terminaison nerveuse ;
- La formation de structures post-synaptiques dans les cellules cibles.

Ces étapes dépendent d'interactions intercellulaires médiées par des signaux, responsables de la reconnaissance par l'axone de la cellule post-synaptique appropriée et de la coordination de la formation des différentes structures pré- et post-synaptiques au niveau de la synapse.

Dès que le contact se forme entre l'extrémité d'un axone en croissance, et un myotube, une neurotransmission existe, même sous une forme rudimentaire, notamment par l'intermédiaire des vésicules d'acétylcholine. Cela va aboutir à la création des zones synaptiques notamment grâce à de nombreux signaux rétrogrades, allant du muscle vers l'axone. En effet, les seules propriétés intrinsèques des différents éléments cellulaires mises en jeu sont insuffisantes. Des études ont ainsi montré qu'après dénervation, les synapses étaient capables de régénérer, en particulier en regard d'une membrane post-synaptique conservée. De même, la spécialisation présynaptique de l'axone débute uniquement après un contact musculaire. Il existe donc, à l'évidence, un rétrocontrôle musculaire sur les axones, mais les mécanismes n'en demeurent pas moins flous.... Deux molécules d'adhésion cellulaire, la N-CAM et la N-cadhérine, présentes au niveau des terminaisons axonales et des myotubes, stabiliseraient le contact muscle/ nerf.

La formation synaptique achève celle du système nerveux en lui permettant d'acquérir sa fonctionnalité. Elle nécessite une organisation spatiotemporelle rigoureuse : la terminaison nerveuse doit atteindre une zone spécifique de la cellule cible ; la membrane post-synaptique nécessite d'être hautement sensibilisée au neurotransmetteur largué par la terminaison nerveuse correspondante. Cet ensemble fonctionnel doit être suffisamment stable pour se pérenniser tout au long de l'existence, mais en même temps être suffisamment plastique pour évoluer avec les processus d'apprentissage. La synaptogénèse est aussi un processus hautement spécifique : même si les cellules pré- et post-synaptiques peuvent synthétiser leurs propres composants, l'échange de nombreux signaux est nécessaire pour coordonner leur activité à chaque instant. En ce qui concerne la jonction neuromusculaire, des modèles *in vitro* ont initialement montré que deux molécules, l'agrine et l'ARIA-neuréguline $\beta 1$ pouvaient être responsables de l'accumulation, de la synthèse et de la maturation des récepteurs de l'acétylcholine. Les stratégies d'invalidation des gènes codant pour ces deux molécules ont été utilisées chez la souris pour préciser leur rôle au cours du développement de la jonction.

Les concepts récents ont permis d'affiner très nettement le rôle de chacune de ces molécules dans la maturation de la jonction neuromusculaire. MuSK reste la plaque tournante de la différenciation post-synaptique. L'accumulation et la synthèse des récepteurs d'acétylcholine sont guidées par l'agrine (agrégation des récepteurs via l'interaction du complexe MuSK/agrine avec la rapsyne mais aussi une action propre s'opposant à leur séparation) et Dok-7 qui permet leur phosphorylation à MuSK.

La maturation des récepteurs d'acétylcholine résulterait, elle aussi de l'interaction agrine/MuSK via l'implication de GTPases (Rac/Cdc42) dans la régulation transcriptionnelle des sous-unités du récepteur.

La neuréguline émanant du nerf agirait essentiellement par son interaction avec ses récepteurs situés à la surface de la cellule de Schwann terminale et se positionne à présent comme une molécule clé du maintien de la cellule de Schwann et donc, par ce biais, de la régénération nerveuse.

L'implication dans les synapses du système nerveux central de certains de ces interlocuteurs moléculaires, illustre bien la complexité des interactions antéro et rétrogrades nécessaires à la formation, au développement et au maintien de la jonction neuromusculaire.

B. Le nerf traumatisé

1. Physiologie du nerf traumatisé

Les traumatismes des nerfs périphériques sont fréquents et sources de handicaps significatifs. Leur prise en charge aboutit dans certains cas à une récupération fonctionnelle, restant cependant souvent incomplète et aléatoire.

a. Mécanismes physiopathologiques

Les étiologies les plus courantes sont les accidents de la voie publique, au premier chef desquels on retrouve les accidents des deux roues. Statistiquement, les lésions des nerfs périphériques sont plus fréquentes au niveau des membres supérieurs (73,5% des lésions traumatiques), concernant en particulier le nerf ulnaire. Les mécanismes lésionnels les plus fréquemment impliqués sont la traction, la section, l'écrasement et dans une certaine mesure l'ischémie en rapport avec les effets d'une compression sur le nerf périphérique :

Ce mode de souffrance du nerf périphérique est celui qui caractérise la genèse des syndromes canalaux quel qu'en soit le siège.

Une compression brève va générer un arrêt de la conduction nerveuse et des transports axonaux, entraînant une paralysie totale motrice et sensitive (ischémie aiguë, suivie d'une restauration survenant en quelques minutes).

Une compression chronique entraîne une dégénérescence limitée par l'intégrité des membranes basales. Au début apparaissent une distorsion et un télescopage de la myéline paranodale.

Plusieurs couches de myéline peuvent être atteintes, avec ralentissement de la conduction. Au niveau du segment atteint, la myéline peut constituer des bulbes d'oignons et entraîner une augmentation quantitative du collagène endoneural.

Des phénomènes ischémiques coexistent avec rupture de la barrière hémato-endoneurale.

La perennisation de la compression aboutit à une dégénérescence du nerf distal, avec amyotrophie, la paralysie étant de survenue tardive.

La levée de la compression va entraîner une restauration complète de la fonction si elle est pratiquée avant la survenue de cette dénervation dont le meilleur exemple est le fait de tous les syndromes canaux et de l'efficacité de leur traitement. La myéline ancienne disparaît et une prolifération des cellules de Schwann assure sa reconstitution.

Des phases répétées de démyélinisation et de remyélinisation peuvent se succéder, voire coexister dans des zones voisines. Les segments nerveux atteints montrent des formations de cellules de Schwann en bulbe d'oignon, et une augmentation du tissu interstitiel endoneural par du collagène.

La continuité des membranes basales autorise de façon très prolongée la récupération fonctionnelle après traitement.

2. Dégénérescence nerveuse

Au cours des lésions traumatiques aiguës ou lors de compressions chroniques n'entraînant pas de rupture de la continuité axonale (lésions de premier degré), on constate comme seule anomalie morphologique évidente, des modifications de la gaine de myéline, commençant par une contusion, s'étendant jusqu'à la région paranodale concernée. Elle peut s'étendre à quelques segments adjacents et engendrer une diminution des vitesses de conduction. Dans les lésions aiguës, on peut observer des blocs de conduction alors que l'examen électrophysiologique de chacune des extrémités nerveuses reste normal. Il existe un processus régénératif qui aboutit à une remyélinisation, après élimination de la gaine de myéline lésée.

Dans les compressions chroniques, les phases de démyélinisation/ remyélinisation se succèdent pour aboutir à la formation d'une morphologie segmentaire en bulbe d'oignon, liée

à la prolifération des cellules de Schwann et à l'expansion du contenu interstitiel endoneural envahi par du matériel collagénique.

Dans les lésions du second degré et plus, il existe des changements visibles au niveau du site lésionnel mais c'est surtout le segment distal qui va être le siège d'un processus de dégradation antérograde appelé dégénérescence wallérienne, selon une cascade d'évènements dont le déclenchement initial est calcium-dépendant. Les premières modifications aboutissent à une fragmentation axonale et myélinique et débutent dans les heures qui suivent le traumatisme. Elle se produit selon la même cinétique que la dégénérescence antérograde wallérienne, une dégénérescence rétrograde. Elle ne touche en général que quelques segments avec une séquence lésionnelle identique.

La dégénérescence est maximale après section du nerf comportant ipso facto une interruption des membranes basales et la faillite fonctionnelle du pôle émetteur du neurone, l'arbre somatodendritique en étant le pôle récepteur. La réponse du nerf périphérique est unique, ce qui le différencie des éléments constitutifs du système nerveux central. L'existence de mécanismes compensateurs initiés, au sein des motoneurones, lors de processus pathologiques ou traumatiques ne fait nul doute aujourd'hui (Grimby et al., 1989 ; Trojan et al., 1991). Il a ainsi été démontré qu'après des lésions axonales, les lésions du système nerveux périphérique étaient capables de régénérer leurs axones pour réinnervier des cibles variées (Fu et Gordon, 1997).

3. Mécanismes de réparation neuronale

Dans les traumatismes sévères, la régénération ne commence qu'après l'aboutissement de la phase de dégénérescence wallérienne alors que dans les lésions modérées, le processus débute presque immédiatement. Une cascade d'évènements succède au traumatisme, mettant en jeu des facteurs neurotrophiques et des molécules de signalisation cellulaire. Les cellules de Schwann y jouent un rôle indispensable, d'une part en intensifiant la synthèse de molécules d'adhésion à leur surface et en favorisant la croissance de la matrice protéique extracellulaire ; et d'autre part, en activant certains gènes par le biais de facteurs neurotrophiques se liant à des récepteurs tyrosine kinase.

a. Bourgeonnement axonal

Lorsqu'une lésion survient sur un nerf périphérique, un axone repousse à partir du fragment proximal jusqu'au fragment distal en cours de dégénérescence, en le colonisant par tunnellation pour atteindre de nouveau la synapse et reformer une nouvelle terminaison nerveuse. Les motoneurones peuvent ainsi constituer une nouvelle jonction neuromusculaire, mais aussi des synapses des trois types d'axones du système nerveux périphérique (moteur, sensoriel et autonome).

Le principal mécanisme mis en jeu est représenté par le bourgeonnement axonal (BA). Celui-ci permet aux motoneurones survivants d'augmenter la taille de leur unité motrice (UM) (incluant le motoneurone et toutes les fibres musculaires innervées par celui-ci) en allant réinnervier les fibres musculaires dénervées pour atteindre jusqu'à trois à huit fois la taille d'une unité motrice normale (Brown et Irons, 1978 ; Fisher et al., 1989 ; Gordon et Pattullo, 1993 ; Jansen et Fladby, 1990 ; Rafuse et al., 1992 ; Tam et al., 2001 ; Thompson et Jansen, 1997 ; Yang et al., 1990). Cependant, lorsqu'il ne reste plus que 20% d'unités motrices fonctionnelles, la capacité d'accroissement de l'unité motrice est insuffisante pour réinnervier toutes les fibres musculaires dénervées : on assiste alors à la survenue d'une amyotrophie (Luff et al., 1988 ; Rafuse et al., 1992 ; Rafuse et Gordon, 1996a, 1996b).

Le bourgeonnement axonal permet l'émergence de fines ramifications axonales en provenance des axones sains. Il débute au niveau de l'extrémité proximale des fibres lésées, habituellement dans les heures qui suivent le traumatisme, mais il peut parfois s'écouler plusieurs jours avant que le prolongement cellulaire n'émerge de l'extrémité proximale lésée. Un cône de croissance se forme à l'extrémité de l'axone en régénération. Il s'agit d'un appareil spécialisé, capable de motilité, doué de propriété « d'exploration ». Les caractéristiques du tissu cicatriciel au niveau du site traumatique, si elles sont défavorables, peuvent empêcher l'axone de rejoindre l'extrémité distale, s'égarent alors dans le tissu conjonctif, poussent de façon anarchique pour former un névrome au niveau du moignon proximal. Quelques axones peuvent tout de même franchir la cicatrice, réalisant alors un névrome en continuité.

Trois catégories de bourgeonnement axonal sont définies en fonction du niveau d'émergence du bourgeon : le sprouting dit « ultra-terminal » dirige le bourgeon axonal jusqu'aux jonctions neuromusculaires avec une émergence provenant de l'axone principal juste avant son épanouissement dans les gouttières synaptiques ; le sprouting préterminal émergeant plus à distance de la terminaison axonale ; et le sprouting nodal en regard des nœuds de Ranvier. Une germination axonale intense devient nécessaire lorsque plus de 85% des motoneurones ont été détruits, et reste aléatoire lorsque seuls 20% de ces derniers subsistent. Dans les cas extrêmes, un seul axone peut alors émettre plusieurs types de bourgeonnement, voire même

plusieurs pousses de même type. La capacité des motoneurones à accroître le nombre de fibres musculaires au sein de leur unité motrice, grâce au bourgeonnement axonal, par un facteur 3 à 8, a été mise en évidence par des expériences électrophysiologiques (Brown et Irons, 1978 ; Fisher et al., 1989 ; Gordon et Pattullo, 1993 ; Thompson et Jansen, 1977). De plus, il a été démontré que malgré une diminution du nombre d'unités motrices lors de dénervations, les unités motrices restantes compensaient par une augmentation de contractilité proportionnelle à l'importance de la dénervation (Rafuse et al., 1992 ; Tam et al., 2001).

Le bourgeonnement axonal est un paramètre fondamental à considérer dans la tentative de compréhension des mécanismes physiopathologiques responsables d'une perte motoneuronale mais aussi dans les implications cliniques qu'il peut susciter dans le cadre de pathologies variées comme la polyomyélite, la sclérose latérale amyotrophique, les lésions nerveuses traumatiques partielles ou même les dénervations fonctionnelles.

Malgré les tentatives de compensation motrice mises en jeu dans ces pathologies, il a été clairement montré qu'une absence ou à l'inverse une trop grande activité neuromusculaire était néfaste au bourgeonnement axonal dans les muscles partiellement dénervés de ces malades.

b. Facteurs neurotrophiques

Le bon déroulement des processus de dégénérescence /régénération requiert un système de communication cellulaire sophistiqué, déclenchant des cascades de signalisation cellulaire complexes ainsi qu'un système de facteurs trophiques élaborés, similaire à celui des processus inflammatoires. Des facteurs comme le NGF ou le BDNF et bien d'autres ont été identifiés et participent à la survie cellulaire et à sa maintenance en conditions normales. Le NGF est, par exemple, modulé de façon extrêmement dynamique par la cible du nerf périphérique puis transporté au niveau du corps cellulaire par le flux axonal rétrograde. Sa concentration au niveau du corps cellulaire diminue au cours d'un traumatisme. Elle pourrait être le facteur moléculaire déclenchant des processus de réparation. Ces facteurs neurotrophiques se lient à des récepteurs spécifiques qui transmettent la signalisation cellulaire et régulent l'activation de nombreux gènes. On retrouve par exemple ces récepteurs sur les cellules de Schwann formant les bandes de Büngner, leur concentration augmentant après le traumatisme. Ils sont eux-mêmes soumis à des mécanismes de régulation complexes. Le NGF est aussi retrouvé dans le cône de croissance et transmis au corps cellulaire de manière rétrograde stimulant ainsi continuellement la croissance axonale, de même qu'il la guide par une interaction avec les cellules de Schwann.

c. Conséquences fonctionnelles potentielles

La régénération axonale n'implique pas une récupération fonctionnelle *ad integrum*. Elle se termine par un processus de maturation au sein du nouvel axone à une vitesse inférieure à celle de sa première phase de croissance, pouvant durer jusqu'à un an. La remyélinisation suit un scénario superposable à celui observé au cours du développement aboutissant à un alignement de cellules de Schwann qui enveloppent chaque axone d'une gaine multilamellée de myéline. Elle débute dans les deux semaines qui suivent le début de la régénération axonale.

- **Récupération fonctionnelle.**

Elle ne nécessite pas obligatoirement une restitution parfaite de l'architecture nerveuse. Cependant, les effets d'une dénervation prolongée, altérant significativement la récupération fonctionnelle, sont proportionnels à sa durée d'évolution. Ils sont liés à la fois aux difficultés de régénération nerveuse mais aussi aux modifications de la cible au niveau périphérique et central (neuroplasticité).

Le facteur clé de la régénération nerveuse est la conservation des membranes basales.

Même en cas de récupération motrice significative, le pronostic fonctionnel est grevé par les déficits sensitifs concomitants, en particulier proprioceptifs. Les récepteurs sensitifs peuvent persister au-delà d'un an et permettre ainsi des reconnexion fonctionnelles. Le schéma sensitif est relativement bien conservé dans les lésions du premier et second degré du fait de la connexion des bons axones aux bons récepteurs. Après des lésions plus sévères et une réparation nerveuse, la récupération sensitive n'est jamais complète. Enfin, il y a le caractère très médiocre de possibilité de régénération des fibres végétatives. De nombreux facteurs participent à ce phénomène notamment l'impossibilité pour certains axones de regagner les récepteurs, l'existence de réinnervations croisées, ainsi qu'une possible dégradation de certains récepteurs ou enfin des modifications corticales liées à la neuroplasticité.

- **Neuroplasticité**

Une lésion du nerf périphérique et sa régénération vont entraîner des modifications fonctionnelles des aires corticales correspondantes. Ces modifications se retrouvent au niveau des projections thalamiques, du tronc cérébral et probablement au niveau médullaire selon une séquence inconnue. Ce phénomène entre dans le cadre de la plasticité cérébrale. Le recouvrement sera total si les zones dénervées sont limitées, partielles si elles sont étendues avec des zones corticales résiduelles silencieuses. L'échéance de ces substitutions-réorganisations se divise en une première phase précoce de réactivation rapide de quelques

heures, 24 heures après le traumatisme et en une deuxième phase ensuite plus progressive. On observe les mêmes phénomènes sur le versant moteur. Au cours des lésions des nerfs périphériques, il existe des modifications sensorielles dues aux modifications corticales : des sensations aberrantes dues aux substitutions d'influx et à la surreprésentation des zones adjacentes générant une hyperpathie, des difficultés de localisation, une astéréognosie, une hypersensibilité (hyperesthésie, hyperpathie, dysesthésies). Les douleurs de membres « fantômes » trouvent une partie de leur substrat anatomique dans ces remaniements. La régénération du nerf périphérique, imparfaite, va de nouveau perturber cette organisation. La reconquête des aires de projection restera en général incomplète, même après une durée d'évolution longue. Elle se fait souvent dans le désordre, en patch, certaines zones réinnervées pouvant avoir plusieurs représentations ou aucune. Ces représentations peuvent être mal localisées. La dernière réorganisation aboutit à une aire de représentation corticale plus petite, disharmonieuse, conservant des patches de représentation des zones adjacentes.

V. LES EFFECTEURS SCHWANNIENS DE LA MAINTENANCE MYELINIQUE/ LES REGULATEURS TRANSCRIPTIONNELS MAJEURS DU PROCESSUS DE MYELINISATION ET DE DEMYELINISATION

Les facteurs de transcription du domaine Pou sont des régulateurs importants des cellules de Schwann dans le délai et le taux de transition pour le passage des cellules de Schwann de la phase promyélinisante à la phase myélinisante (Bermingham et al., 1996 ; Jaegle et al., 1996, 2003). Alors que dans les nerfs des rongeurs normaux, la grande majorité des cellules de Schwann à myéline compétente font la transition dans la première semaine postnatale, les cellules de Schwann mutants pour Oct6/Scip initient cette transition avec 1 à 2 jours de retard et le font avec une cinétique altérée. La délétion de l'ensemble Oct6/Scip et Brn2 entraîne un phénotype sévère avec persistance des cellules de Schwann à l'état promyélinisant à l'âge adulte et des axones hypomyélinisés. La cible majeure de la régulation d'Oct6/Brn2 est immédiatement le gène précoce EGR2/Krox20. Des études précédentes sur des souris ont identifié Egr2/Krox20 comme un facteur de transcription requis pour le développement des cellules de Schwann en cellules myélinisantes (Topilko et al., 1994). Les nerfs périphériques de souris avec suppression d'Egr2/Krox20 présentent des niveaux inférieurs de gènes majeurs de myéline avec des cellules de Schwann arrêtés au stade promyélinisant, incapables de se

différencier en cellules myélinisantes. Des analyses indépendantes de souris avec l'allèle *Egr2* hypomorphe (*Egr2* Lo/Lo) ont confirmé les observations précédentes (Le et al., 2005a).

Des aperçus supplémentaires critiques de la régulation transcriptionnelle de la myélinisation a mis en évidence la zone HMG contenant le facteur de transcription Sox10 comme un médiateur intégral de la différenciation des cellules de Schwann. Sox10 est spécifiquement exprimé dans les cellules de Schwann et d'autres cellules de la crête neurale dérivées de tissus et est requis pour la spécification des cellules de Schwann de la crête neurale (Britsch et al., 2001 ; Kuhlbrodt et al., 1998b). Sox10 appartient à la classe E des facteurs Sox, qui inclut aussi Sox8 et Sox9 (reviewé dans Wegner et Stolt, 2005). En effet, des études récentes issues du groupe Wegner ont mis en évidence une redondance fonctionnelle dans un contexte spécifique de développement incluant la différenciation des oligodendrocytes (Finch et al., 2008 ; Stolt et al., 2004).

Cependant, Sox10 apparait être un membre prééminent de cette famille régulant des cellules de Schwann.

A. Coordination des processus de myélinisation

Le facteur de transcription Krox20 est la cible majeure de la régulation d'Oct6 et de Brn2. L'activation de la transcription d'*Egr2* des cellules de Schwann est médiée à travers un élément du locus d'*Egr2* agissant en cis appelé « myelin associated Schwann cell enhancer ou mSCE (Ghislain et Charnay 2006 ; Ghislain et al., 2002). Des expériences de cotransfection ont montré qu'Oct6/Brn2 et Sox10 sont activés en synergie par le biais de ce mSCE (Ghislain et Charnay, 2006 ; Kuhlbrodt et al., 1998a). Bien qu'Oct6 et Brn2 sont régulés transitoirement à la hausse pendant la différenciation des cellules de Schwann, Sox10 est exprimé à tous les stades de développement de la lignée des cellules de Schwann (Jaegle et al., 2003 ; Kuhlbrodt et al., 1998b ; Sim et al., 2002). L'analyse de Sox10 hypomorphique des souris pour lesquels ce facteur a été muté confirme encore l'implication de Sox10 dans la régulation d'Oct6/Scip. La relation de régulation entre Sox10, Oct6, Brn2 et Krox20 ressemble à un système dans lequel le facteur A (Sox10) active le facteur B (Oct6/Scip) et par la suite, active en synergie avec B le facteur C (Krox20). Un circuit de régulation a été mis en évidence à travers des observations que les cellules de Schwann promyélinisantes chez des animaux présentant une mutation de *Lig4* ont un retard de développement similaire à ce qui est observé chez les animaux dont Oct6 est muté (Bermingham et al., 2002, 2006 ; Darbas et al., 2004). Comme *Lig4* est une molécule

exprimée et sécrétée dans les cellules de Schwann, il est concevable qu'elle module la voie de signalisation qui déclenche l'activation d'Oct6/Scip ou Sox10 à travers des modifications telles que la phosphorylation et l'acétylation ou la traduction, ou la stabilité de l'ARNm de Krox20. Il est récemment montré qu'Oct6/Scip contient un signal nucléaire qui permet l'élimination rapide d'Oct6/Scip du noyau (Baraneck et al., 2005). Il est cependant probable que ce mode de régulation joue un rôle dans les cellules de Schwann avec mutation de *Lig4* (Darbas et al., 2004).

Tout mécanisme posttraductionnel agissant sur Oct6/Scip devrait aussi l'être sur Brn1 (Pou3f3) comme il a été montré que Brn1 peut jouer pleinement la fonction d'Oct6/Scip dans les cellules de Schwann en différenciation chez des souris pour lesquelles une mutation sur le gène Brn1 a été induite (Friedrich et al., 2005). Oct6/Scip et Brn2 fonctionnent comme activateurs de l'expression de gène, en particulier Krox20. Cependant, des expériences de cotransfection dans des cultures primaires de cellules de Schwann ont montré qu'Oct6/Scip peut aussi fonctionner comme un répresseur de gènes majeurs de myéline comme la Myelin protein zero (Mpz) et la Myelin basic protein (Mbp) (Monuki et al., 1990, 1993). L'analyse d'animaux mutés pour Oct6/Scip n'a pas confirmé son rôle répressif dans les cellules de Schwann promyélinisantes, par contre en son absence, les niveaux d'ARNm de MBP et de PMP22 ainsi que ceux de la protéine MPZ sont fortement réduits (Jaegle et al., 1996).

1. La régulation d'Oct-6/ Scip

Oct6/Scip est à l'origine décrit comme un facteur du domaine POU qui est réprimé dans les cultures primaires de cellules de Schwann de rat mais dont l'expression est régulée à la hausse avec une cinétique intermédiaire suivant l'administration de cAMP (Monuki et al., 1989). L'activation de la protéine kinase A (PKA), le principal cible du second messenger cAMP, dans les cultures de cellule de Schwann induit une régulation à la hausse des gènes impliqués dans la myélinisation, posant ainsi l'hypothèse que PKA aurait un rôle dans le processus de myélinisation (Morgan et al., 1991 ; Sobue et al., 1986). En effet, l'inhibition de l'activité de PKA entraîne une réduction de la myélinisation dans les cocultures de cellule de Schwann et de neurones (Howe et McCarthy, 2000). Une cible majeure de la signalisation de PKA est l'élément de réponse de cAMP se liant à la protéine ou Crebp. Crebp est phosphorylé par PKA suivant l'administration de cAMP aux cellules de Schwann mais son effet direct sur l'expression d'Oct6/Scip n'est pas clair (Lee et al., 1999). Un autre cible de PKA est le NFkB,

un facteur de transcription impliqué dans la prolifération et la différenciation d'une variété de cellules (Zhong et al., 1998). NFkB est indispensable dans les cellules de Schwann pour l'activation d'Oct6/Scip et la myélinisation (Nickols et al., 2003). L'activité transcriptionnelle de NFkB peut être régulée à travers la phosphorylation par PKA à Ser276 de p65 et l'inhibition de PKA entraîne une diminution de la formation de la myéline dans les cocultures de cellule de Schwann et neurones (Yoon et al., 2008). Bien que le NFkB activé entraîne une élévation du niveau de protéine dans les cultures de cellules de Schwann, il n'affecte pas le niveau d'ARNm d'Oct6/Scip suggérant que le NFkB régule l'expression d'Oct6/Scip dans les cellules de Schwann au stade post-transcriptionnel. L'expression d'Oct6/Scip *in vivo* est contrôlée par les signaux axonaux incluant la Neureguline1 de type III (Leimeroth et al., 2002 ; Scherer et al., 1994 ; Taveggia et al., 2005). Ces signaux convergent vers le gène Oct6/Scip des cellules de Schwann localisées en aval du gène pour réguler chaque aspect de l'expression d'Oct6/Scip des cellules de Schwann (Ghazvini et al., 2002 ; Mandemakers et al., 2000). En effet, l'allèle hypomorphe de Sox10 supporte le développement des cellules de Schwann mais les cellules ne régulent pas positivement Oct6/Scip dans la vie tardive fœtal (Schreiner et al., 2007). Une analyse plus poussée identifierait des éléments de Sox10 qui confèrent le contrôle temporel de l'activation du gène Oct6/Scip.

Au cours du développement normal du nerf, l'expression d'Oct6/Scip est rapidement éteinte dans les cellules de Schwann myélinisantes. Le mécanisme par lequel l'expression d'Oct6/Scip est régulé négativement n'est pas encore connu. Il est aussi montré que Krox20/Egr2 est impliqué dans l'extinction de l'expression d'Oct6/Scip dans les cellules myélinisantes comme la suppression de Krox20/Egr2 leur fait perdre la capacité à réguler négativement Oct6/Scip (Zorick et al., 1999). Il est possible que la région promotrice d'Oct6/Scip contiennent de multiples sites de liaison de Krox20/Egr2. Il a été montré que Krox20/Egr2 joue un rôle de répresseur transcriptionnel à travers son interaction avec les répresseurs Nab. Cependant, il manque des preuves qui confirment la régulation négative de Krox20/Egr2 sur Oct6/Scip. L'identification des facteurs impliqués dans l'extinction de l'expression d'Oct6/Scip est important, ces facteurs pourraient contribuer au développement des neuropathies périphériques. Effectivement, l'expression forcée d'Oct6 dans les cellules de Schwann au delà des premières stades myélinisantes entraîne une hypomyélinisation et une perte axonale soulignant un besoin de régulation négative d'Oct6 au cours du développement normal (Ryu et al., 2007).

2. Le rôle de Sox10 dans les cellules de Schwann myélinisantes

Bien que l'expression de Sox10 soit maintenue dans les cellules de Schwann myélinisantes, le phénotype embryonnaire précoce de souris « knockout » empêche les essais de tester le rôle définitif de Sox10 au cours de la myélinisation assurée par les cellules de Schwann (Britch et al., 2001). Sox10 régule l'entrée au stade promyélinisant à travers son rôle d'induction sur Oct6/Scip et Krox20/Egr2. En plus, Sox10 intervient tout au long du processus de myélinisation. Beaucoup de gènes de la myéline conservent les sites de liaison de Sox10 qui sont importants pour assurer sa fonction (Bondurand et al., 2001 ; Denarier et al., 2005 ; Peirano et al., 2000) et la liaison de Sox10 à ces sites a été montré dans les nerfs sciatiques myélinisantes *in vivo* (LeBlance et al., 2007). Enfin, des mutants Sox10 ont été identifiés dans plusieurs maladies humaines incluant des défauts de la myéline périphérique, des neuropathies périphériques démyélinisantes, la leucodystrophie démyélinisante, le syndrome de Waardenburg et la maladie de Hirschsprung (Inoue et al., 2004). Sox10 n'a pas qu'un rôle dans la différenciation des cellules de Schwann mais joue aussi un rôle dans l'initiation de la myélinisation. La caractérisation initiale de souris déficientes en Sox10 a montré qu'il est nécessaire pour l'expression embryonnaire de *Mpz* et se lie à plusieurs sites dans le promoteur de *Mpz* (Peirano et al., 2000). Utilisant ces sites cibles, un certain nombre d'études de structure/fonction de Sox10 ont encore élucidé son mécanisme d'action. La caractéristique unique de la classe E des facteurs Sox10 est leur capacité à se lier à l'ADN comme monomères ou dimères. La formation de dimères peut augmenter une affinité apparente comme la liaison du dimère Sox10 aux deux sites adjacents dans le promoteur *Mpz* (Peirano et Wegner, 2000). Un autre aspect frappant de Sox10 est sa capacité à induire « la flexibilité » de l'ADN (Schlierf et al., 2002). Sox8 pourrait jouer le rôle de Sox10 dans le développement du nerf périphérique s'il est exprimé sous les mêmes contrôles de développement (Kellerer et al., 2006). Les mutants Sox10 avec un domaine de dimérisation défectueuse sont capables de supporter le développement initial des cellules de Schwann mais des cellules incapables d'entrer au stade promyélinisant, caractérisé par l'expression d'Oct6/Scip. L'allèle Sox10 dans lequel est deleté le domaine d'activation de K2 peut conduire les cellules de Schwann au stade promyélinisant mais sont incapables d'initier la myélinisation (Schreiner et al., 2007).

B. Régulation transcriptionnelle de la démyélinisation

Si un programme transcriptionnel spécifique doit être réprimé pour permettre la myélinisation, une idée corollaire est que la démyélinisation associée à une lésion nerveuse (ou certains types

de neuropathies périphériques héréditaires) est aussi coordonnée par un programme transcriptionnel spécifique. Les voies impliquées dans la formation des cellules de Schwann non myélinisantes et sa maintenance a été reviewé (Jessen et Mirsky, 2005), et une des voies majeures qui a émergé implique l'activateur C-Jun dont l'implication dans la prolifération des cellules de Schwann a été mis en évidence (Parkinson et al., 2004). Ces études ont décrit une relation antagoniste mutuelle entre Krox20/Egr2 et C-jun qui regule la transition entre cellules de Schwann non myélinisantes et myélinisantes (Parkinson et al., 2008) et ont fourni une base pour les observations précédentes que les cellules de Schwann des souris déficientes en Krox20 ne perdent pas seulement la capacité à myéliniser mais aussi des niveaux élevés de prolifération et d'apoptose (Le et al., 2005a ; Topilko et al., 1994 ; Zorick et al., 1999). Par ailleurs, C-jun est aussi capable de rentrer en antagonisme avec l'expression des gènes de la myéline indépendamment des effets du cycle cellulaire (Parkinson et al., 2008).

Une autre variation de ce thème a été récemment présentée dans une analyse d'un modèle de souris de CMT1B, qui est causée par un gain de fonction des mutants de Mpz. L'expression de ce mutant a montré qu'il provoque une UPR caractérisée par l'induction des facteurs de transcription Chop et le chaperone Bip (Pennuto et al., 2008). Le même mutant Mpz est exposé à une réduction de la démyélinisation, indiquant que l'UPR joue un important rôle dans la démyélinisation causée par ce mutant. Bien que Chop soit impliqué dans la promotion de l'apoptose dans certains systèmes, son activation dans les cellules de Schwann causerait une démyélinisation en absence de l'apoptose. Ces résultats indiquent que le ciblage de l'activité de Chop ou autre médiateur UPR pourrait être une cible attractive pour le traitement de neuropathies périphériques humaines, et il sera important de déterminer si l'activation de Chop entraîne la même conséquence qu'une mutation d'autres gènes de la myéline.

1. Rôle de C-Jun

C-Jun est un composant majeur du complexe de transcription AP-1 mais aussi un composant de la voie de la kinase terminale Jun-N- (Mechta-Grigoriou et al., 2001). Il est fortement exprimé dans les cellules de Schwann immatures à E17 juste avant le début de la myélinisation, dans les cultures de cellules de Schwann et dans les cellules de Schwann des nerfs sectionnés (De Felipe et Hunt, 1994 ; Stewart, 1995 ; Shy et al., 1996 ; Parkinson et al., 2004). In vitro, C-Jun est requis pour la prolifération des cellules de Schwann en réponse à la neureguline-1 (Parkinson et al., 2004) et intervient aussi dans la mort induite par TGF β , un phénomène qui a

lieu aussi bien au cours du développement normal qu'après une section de nerf de nouveau-né (Parkinson et al., 2001 ; D'Antonio et al., 2006b). Contrairement au niveau élevé de C-jun avant la myélinisation et dans les nerfs lésés, les niveaux d'expression de C-jun sont bas à tous les autres stades (Parkinson et al., 2004 ; Bhaskaran et al., 2007). Le profil d'expression suggère que C-jun peut jouer un rôle dans les cellules de Schwann immatures et les cellules de Schwann dédifférenciées. Krox 20 est le facteur de transcription le plus important du contrôle de la myélinisation (Topilko et al., 1994 ; Zorick et al., 1999 ; Nagarajan et al., 2001 ; Parkinson et al., 2004 ; Decker et al., 2006). Krox-20 inactive aussi la réponse proliférative des cultures de cellules de Schwann à la neureguline-1 et la réponse apoptotique de TGF β , toutes les deux sont caractéristiques du phénotype des cellules de Schwann immatures (Parkinson et al., 2001 ; 2004). Krox 20 inhibe C-Jun, ce qui est à l'origine des niveaux faibles de C-jun dans les cellules myélinisantes. Il est observé aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, où les niveaux de C-Jun deviennent élevés dans les nerfs de souris présentant une altération de Krox20 alors que ces niveaux sont supprimés dans les nerfs sauvages. La suppression de C-Jun est vue comme le mécanisme par lequel Krox-20 empêche la prolifération et l'apoptose en réponse à la neureguline-1 et TGF β respectivement (Parkinson et al., 2004). C-Jun est aussi un régulateur important de l'étape de différenciation des cellules de Schwann. Il agit comme un suppresseur du phénotype myélinisant, une fonction indépendante de son rôle dans la prolifération et l'apoptose ; il bloque la myélinisation dans les cocultures de neurones-cellules de Schwann et quand C-Jun est exprimé dans les cellules de Schwann exprimant Krox 20, il empêche la régulation positive de P0 qui a lieu normalement en réponse à l'expression de Krox20 (Parkinson et al., 2008). Cependant, des observations dans des nerfs de souris postnatales avec inactivation de C-jun ont montré que la myélinisation n'a pas été accélérée dans ces nerfs en absence de protéines potentiellement répresseuses du signal de la myélinisation. Cela reflète que dans le nerf normal, C-Jun est effectivement supprimé par le signal de Krox20 au début de la myélinisation. L'expression forcée de C-Jun inhibe l'expression de Krox20, de P0 et de la periaxin en réponse à une élévation des niveaux de l'AMP cyclique.

2. La démyélinisation résulte d'un retard de développement

Pour confirmer que le défaut de la myélinisation résulte d'un retard de développement et pas d'une destruction de la myéline, des nerfs ont été examinés à des âges post-nataux variés. Contrairement aux contrôles, les nerfs sciatiques Tg80.2 (nerf sciatique avec une copie

supplémentaire de 80% de MPZ) à P5 et P14 ne contenaient pratiquement pas de myéline. Aussi, le défaut des axones courts est plus évident à P5 et P14 qu'à P28 par des analyses semi-fines de section. Pour quantifier le manque de formation de la myéline, la branche motrice du nerf en développement a été examinée (quadriceps) comme précédemment décrit (Frei et al., 1999). À P10, moins de 1% des axones ayant établi une relation 1 : 1 avec des cellules de Schwann étaient myélinisés au niveau des nerfs Tg80.2 alors que 100% de ces axones étaient myélinisés chez le nerf sauvage. Un très faible niveau de démyélinisation a été détecté dans les nerfs quadriceps, comme des fragments occasionnels de myéline peuvent être vus avec les axones ou les cellules de Schwann à P10. Ainsi, les caractéristiques anormales des nerfs P28 sont attribuables à un retard de développement mais pas à une destruction de la myéline qui a été synthétisée avant bien que certaines fibres acquièrent leur myéline à l'âge adulte. Les fibres fines myélinisées occasionnellement ne sont pas distribuées au hasard dans des coupes transversales de nerf sciatique. Une possibilité est que les fibres motrices et sensibles sont affectées différemment car les fibres de la colonne vertébrale sont aussi distribuées dans la colonne vertébrale de manière non aléatoire (Ueyama, 1978).

3. La démyélinisation est un phénomène parallèle au dosage et à la surexpression de MPZ

La gravité croissante du phénotype comportemental, électrophysiologique et morphologique est en parallèle avec le nombre de copies croissantes de transgènes. Par exemple, des animaux avec des copies compris entre 0 et 10 (Tg80.3, F80.10) avaient un comportement normal et une myélinisation correcte à P28. Par contre, des animaux avec des copies compris entre 10 et 20 (Tg80.4, F80.7) manifestent de légers tremblements, une vitesse de conduction du nerf égal à 11 m/s (Tg80.4) et une démyélinisation avec 50% des axones larges entourés par des cellules de Schwann isolées qui ne forment pas de myéline. Enfin, des animaux avec des copies supérieures à 20 (Tg80.2, F80.1, F80.8 et F80.9) présentent clairement des tremblements, une vitesse de conduction nerveuse égale à 2 m/s (Tg80.2) et une hypomyélinisation sévère. La confirmation que la sévérité du phénotype est corrélée à une surexpression de MPZ a été faite par RT-PCR. L'analyse des animaux Tg80.2, Tg80.3 et Tg80.4 a montré que MPZ était surexprimé à environ 700%. La surexpression est en parallèle au nombre de copies, de la gravité du phénotype parmi les petits, les moyens et les grands nombres de copies. Pour montrer que MPZ est surexprimé après la naissance, le point de développement où la myélinisation était retardée, une analyse de RT-PCR de Tg80.2 à P2 a été réalisée. Il a été trouvé que le rapport de

MPZ endogène de Tg80 était de 6,9 à P2, très similaire à 7,3 trouvé à P28. Ces données avec la démonstration par immunocytochimie ultrastructurale que P0 est significativement augmenté dans la membrane périaxonal, abaxonal et d'appareil de Golgi avec des cellules de Schwann de Tg80 arrêtés à P5 montre que la surexpression de P0 est associée à une hypomyélinisation congénitale dans des nerfs sciatiques. Dans les Tg80.3 légèrement touchés, la démyélinisation est liée à une expression de MPZ. Comme l'expression de MPZ de Tg 80.3 s'approche de son pic entre P15 et P21 (Stahl et al., 1990), les nerfs sciatiques de Tg80.3 étaient hypomyélinisés comparativement aux contrôles considérant qu'à P28, quand l'expression de MPZ tombe à des niveaux d'adulte, les nerfs sciatiques contiennent des nerfs normaux du point de vue ultrastructurale.

4. Krox20/Egr2 et gènes semblables

Egr2/Krox20 est un membre de la petite famille des gènes de début de la croissance (Early growth response « Egr ») qui incluent Egr1 et Egr3. Krox20 est coexprimé avec le facteur Egr1 dans les cellules de Schwann au début de la myélinisation. A l'opposé, à l'âge de 1 mois, Krox20 est exclusivement exprimé dans les cellules de Schwann myélinisantes alors que Egr1 est confiné aux cellules de Schwann non myélinisantes (Topilko et al., 1997). Inversement, après une lésion nerveuse, Krox20/ Egr2 est régulé négativement et Egr1 est induit. Malgré le profil d'expression « intrigante » de Egr1, aucune déficience n'a été notée dans la myélinisation des nerfs périphériques dans des lignées de 2 KO indépendantes (Lee et al., 1996 ; Topilko et al., 1998). Il est suggéré qu'Egr1 pourrait régulé l'expression du récepteur de neurotrophine p75 (Nikan et al., 1995), qui est exprimé par les cellules de Schwann non myélinisantes et est requis pour une myélinisation effective (Cosgaya et al., 2002). Bien que l'expression de p75 ne soit pas diminuée dans des KO Egr1, Egr3 est aussi coexprimé dans les cellules de Schwann exprimant p75 dans le nerf sciatique. Par ailleurs, un double KO d'Egr1 et Egr3 est à l'origine d'une baisse de l'expression de p75 et des gaines minces de myéline comparable au phénotype causé par une déficience de p75 (Gao et al., 2007). Egr1 et Egr3 partagent de nombreuses propriétés avec Krox20 incluant la capacité d'interagir avec les corépresseurs Nab (Sevetson et al., 2000).

a. L'expression du gène Egr2 est activée par le facteur de transcription sox10

Les cellules de Schwann représentent la population majoritaire des cellules gliales du système nerveux périphérique. Elles peuvent être soit myélinisantes, soit non myélinisantes. Pour être myélinisantes, les cellules de Schwann doivent passer différentes étapes consécutives. Avant le début de la myélinisation, les cellules de Schwann établissent un contact 1/1 avec les axones de calibres larges et commencent à envelopper les axones en faisant un tour et ½ avec leur membrane plasmique (Jessen et Mirsky, 2005). Le facteur de transcription Oct6 de la famille Pit1-Oct1/2-Unc86 (POU) et Brn2 (Jaegle et al., 2003) induisent l'expression de Krox20 (Ghislain et Charnay, 2006) qui à son tour active l'expression de plusieurs gènes de myéline et fonctionne comme le régulateur principal de la myélinisation du système nerveux périphérique (Topilko et al., 1994 ; Nagarajan et al., 2001). Il a été déjà montré que, le HMG-box contient le facteur de transcription Sox10 au cours de tous les stades de développement des cellules de Schwann et continue à être présent dans les cellules de Schwann myélinisantes du système nerveux périphérique adulte (Kuhlbrodt et al., 1998a). Des délétions ciblées chez des souris ont confirmé l'importance de Sox10 pour le développement des cellules de Schwann. Comme les précurseurs des cellules de Schwann, les cellules de la crête neurale perdent leur capacité à se développer chez des souris déficientes en Sox10 (Britsch et al., 2001). Bien que la perte précoce des cellules de Schwann empêche une analyse approfondie des fonctions de Sox10 au cours des stades ultérieures du développement des cellules de Schwann, ceci est un autre point évident pour connaître son rôle. Des défauts des cellules de Schwann portés par des souris mutés hypomorphes de Sox10 (Schreiner et al., 2007) et des résultats d'expression de gènes de myéline provenant de la culture de tissus (par exemple MPZ, connexine-32 et les gènes MAG) est contrôlé par Sox10 (Peirano et al., 2000 ; Bondurand et al., 2001 ; Jones et al., 2007 ; Leblanc et al., 2007). Les gènes de myéline semblent être activés en synergie par Krox20 et Sox10 établissant ainsi que la combinaison de ces deux facteurs de transcription est essentielle pour la myélinisation. En plus, des résultats récents ont montré une liaison entre Krox20 et Sox10. Ghislain et ses collaborateurs ont identifié une région de 1,3 kb, le site responsable de l'expression de Krox20 dans les cellules de Schwann myélinisantes (Ghislain et al., 2002) et ont montré par la suite que ce « MSE » est activé en synergie par Oct6 et Sox10 (Ghislain et Charnay, 2006). Sox10 semble être un facteur central dans l'induction de Krox20 et par cette voie induit le partenaire avec qui, il active les gènes de la myéline.

C. Les régulateurs négatifs de la myélinisation

La myélinisation des cellules de Schwann dépend de l'expression de Krox20 et d'autres facteurs de transcription qui sont activés par les signaux axonaux et contrôlent les cellules formatrices de myéline. Les cellules formatrices de myéline peuvent revenir à un phénotype immature, un processus qui est vu dans les nerfs lésés et les neuropathies démyélinisantes. Au niveau physiologique, c-Jun inhibe l'activation des gènes de myéline par Krox20 et l'adénosine monophosphate cyclique ; il est aussi responsable du retour à l'état immature des cellules de Schwann dans un nerf lésé in vivo. L'expression forcée de c-Jun entraîne une inhibition de la myélinisation des cocultures. Par ailleurs, c-jun et Krox20 présentent des relations fonctionnelles antagonistes. C-jun régule négativement le phénotype des cellules de Schwann myélinisantes représentant un signal qui s'oppose fonctionnellement aux facteurs de transcription de promyéline. La régulation négative de la myélinisation est susceptible d'avoir des conséquences pour trois domaines biologiques des cellules de Schwann : l'analyse moléculaire de la plasticité, les pathologies myélinisantes et la réponse des nerfs périphériques à une lésion.

La transition des cellules de Schwann de l'état immature à l'état de cellules de Schwann myélinisantes dépend de la régulation des gènes de protéines de promyéline comprenant Krox20, Nab1 et 2, Oct-6, Brn2, NFkB, Sox10 (Topilko et al., 1994 ; Bermingham et al., 1996 ; Jaegle et al., 2003 ; Nickols et al., 2003 ; Le et al., 2005a ; Ghislain et Charnay, 2006). Les cellules de Schwann peuvent perdre facilement leur myéline et se différencier à un phénotype qui ressemble à l'état immature et cette transition, comme la myélinisation implique une transformation cellulaire complexe et ordonnée (Jessen et Mirsky, 2005). C'est possible que cette transition inverse nécessite des gènes distincts régulateurs de protéines qui fonctionneraient comme régulateurs négatifs de l'état myélinisé et entraîner les cellules à un phénotype arriéré (phénotype de cellules immatures). La capacité des cellules myélinisantes à se différencier est observée quand elles ne sont plus en contact avec l'axone dans un nerf lésé ou in vitro et aussi dans les neuropathies démyélinisantes. Les cellules différenciées, même chez les adultes peuvent remyéliniser si elles sont associées à des axones dans des conditions appropriées. Potentiellement, ce choix entre deux états de différenciation alternatifs est ouvert aux cellules de Schwann au cours de la vie.

L'étude de gènes régulateurs de protéines qui contrôlent le choix entre les deux devenir alternatifs, ont révélé l'importance de système de signalisation antagoniste où le rôle du devenir est joué par l'équilibre entre les deux ensembles de facteurs de transcription où tous les deux précisent le devenir alternatif et inhibent l'expression ou l'activité de l'autre.

Chez les cellules de Schwann, la spécification de la différenciation en myéline est dépendante du facteur de transcription Krox20. Il est induit par le contact axonal qui induit la myélinisation. Les cellules de Schwann à Krox20^{-/-} perdent la capacité à myéliniser même si elles sont déjà rentrées au stade précoce de la myélinisation, le stade promyélinisant. L'expression forcée de Krox20 dans les cellules de Schwann est suffisante pour induire l'expression de gènes de myéline, éliminant les cellules du cycle cellulaire et réduit la sensibilité à l'apoptose, ce sont des changements de développement qui s'installent lorsque la myélinisation commence. L'expression de Krox20 établit et/ou amplifie un ensemble de changements associés au devenir de la myéline (Nagarajan et al., 2001 ; Topilko et Meijer, 2001 ; Parkinson et al., 2004). Le facteur de transcription C-Jun est un composant clé du complexe du facteur de transcription AP-1 et forme la famille de protéine Jun avec JunB et JunD (Meichthart-Grigoriou et al., 2001). Bien que la phosphorylation de C-Jun est importante pour beaucoup de ses fonctions, d'autres sont indépendantes de sa phosphorylation mais dépendent de la présence de protéines (Raivich et Behrens, 2006). C-jun est présent chez les cellules de Schwann immatures mais son expression est réprimée par Krox20 (Parkinson et al., 2004). Les cellules de Schwann expriment ainsi des niveaux bas de C-jun quand elles commencent à devenir myélinisantes. C-Jun est un régulateur important de la différenciation des cellules de Schwann parce qu'il agit en suppresseur efficace du phénotype myélinisant. Cette fonction est indépendante de son rôle dans la prolifération et la mort. C-jun bloque la myélinisation dans les cocultures de neurones-cellules de Schwann, oppose la fonction aux signaux de myéline liés à Krox20 et c-AMP et entraîne la dédifférenciation des cellules commençant à devenir myélinisantes au phénotype immature de cellules de Schwann. Ces résultats ont été observés aussi bien in vivo qu'in vitro en utilisant des souris avec une inactivation conditionnelle de C-Jun dans les cellules de Schwann. Certains de ces effets de C-Jun sont possibles par l'intermédiaire de Sox2, un facteur de transcription qui inhibe la myélinisation (Le et al., 2005b). C-Jun inhibe l'expression de Krox20. Pendant que Krox20 dirige le programme de myélinisation, C-Jun est un régulateur négatif de la myélinisation.

1. La surexpression de Pou3f1 conduit à une hypomyélinisation persistante et une perte axonale dans le système nerveux périphérique

Les souris « CondPou3f1 : MPZ (Cre) » ne peuvent pas être distinguées des contrôles à la naissance et beaucoup de ces animaux survivent jusqu'à au moins l'âge de 10 mois. Bien que les souris « condpou3f1 : MPZ(Cre) » soient de poids similaire à la naissance que les contrôles,

ils ne grandissent pas normalement et à l'âge de 6 mois, ils pèsent 40% de moins que les types sauvages. A l'âge de 3 semaines, les souris « *condpou3f1 : MPZ (Cre)* » semblent faibles et commencent à trainer leur membre postérieur quand ils se déplacent, une posture qui est caractéristique de la souris avec une faiblesse musculaire causée par la neuropathie périphérique. Les souris « *Cond pou3f1 : MPZ (Cre)* » présentent également des tremblements légers, une altération de la coordination similaire à celles observée dans les autres souris avec déficit de la myélinisation périphérique (Suter et al., 1992 ; Le et al., 2005a,b). Parce que la myélinopathie dans la moelle épinière pourrait également entraîner des troubles moteurs, le déficit moteur des souris de « *Cond pou3f1 : MPZ (Cre)* » est causé par des déficiences de myélinisation périphérique (Elisabeth J.R et al., 2007 : *misexpression of pou3f1 results in peripheral nerve hypomyelination and axonal loss*). Au cours de l'embryogenèse, les précurseurs des cellules de Schwann migrent le long des axones, les englobent, sélectionnent les axones uniques pour la myélinisation. A la naissance, ces cellules de Schwann promyélinisantes établissent une relation 1 : 1 avec les axones et commencent à les myéliniser. Ces cellules de Schwann myelinisantes précoces expriment des niveaux relativement élevés de *pou3f1* et commencent à exprimer *Egr2*. Pour examiner l'effet de surexpression de *Pou3f1* dans des cellules de Schwann sur la myélinisation des nerfs périphériques, Elisabeth J.R et ses collaborateurs dans « *misexpression of pou3f1 results in peripheral nerve hypomyelination and axonal loss* » ont examiné des nerfs sciatiques de souris de type sauvage et de « *Cond pou3f1 : MPZ (Cre)* ». Après un examen macroscopique de section de nerf de 1µm de souris « *Cond pou3f1 : MPZ (Cre)* » à l'âge de P14 et 6 mois, cet examen confirmait une myélinisation anormale de plusieurs axones ne contenant pas de myéline ou de très fines gaines de myéline. L'examen au microscope électronique de nerf sciatique de souris « *Cond pou3f1 : MPZ (Cre)* » a déjà montré une hypomyélinisation évidente même au stade précoce de la myélinisation (P4). A P14, lorsque la myélinisation est complète, plusieurs cellules de Schwann des nerfs de « *Cond pou3f1 : MPZ (Cre)* » sont bloquées à envelopper uniquement les axones, alors que dans le type sauvage, il y a beaucoup d'axones abondamment myélinisés. Des axones myélinisés, beaucoup possède une gaine de myéline qui est significativement plus mince que la normale. Un phénotype similaire de nerf est remarquable à tous les autres âges examinés incluant P28 et 4,6 et 10 mois. Des sections sur paraffine de 1µm d'épaisseur de nerf fémoral moteur et sensitive de souris « *Cond pou3f1 : MPZ (Cre)* » ont montré une hypomyélinisation similaire aux nerfs sciatiques de ces souris. En plus, des analyses ont révélé que l'étendue de l'hypomyélinisation semblait être équivalente dans les nerfs sensitifs et moteurs dans les souris « *Cond pou3f1 : MPZ (Cre)* » indiquant qu'il n'y a aucun biais des nerfs moteurs par rapport

aux nerfs sensitifs dans ce modèle de souris hypomyélinisant. Bien que la grande majorité des axones des nerfs « *Cond Pou3f1 : MPZ (Cre)* » étaient hypomyélinisés, il y avait des nerfs normalement myélinisés occasionnellement présent même chez les animaux adultes, ce qui constitue probablement le résultat d'une incomplète activation de Cre du transgène conditionnel de *pou3f1*. Pour mieux caractériser les défauts de myélinisation causés par une surexpression de *pou3f1*, on calcule la distribution g-ratio (diamètre des axones divisés par le total des diamètres des axones myélinisés) à l'âge de P14 et 6 mois chez les animaux mutants et de type sauvage. Cette analyse indiquent que beaucoup de cellules de Schwann chez les souris « *Cond Pou3f1 : MPZ (Cre)* » se détachent en une pellicule et donnent ainsi naissance à un nombre plus élevé d'axones hypomyélinisés (g ratio proche de 1,0). Beaucoup d'axones hypomyélinisés sont myélinisés par des cellules de Schwann qui possèdent un noyau élargi, alors que dans les nerfs contrôles, beaucoup de noyaux de cellules de Schwann sont compactés et ne sont pas clairement visibles. Les axones de grand et petit calibre sont hypomyélinisés à nombre égal. Ainsi, contrairement aux souris invalides pour *Pou3f1*, l'hypomyélinisation causée par une expression persistante de *pou3f1* continue tout au long de la vie de ces animaux.

2. Une expression constitutive de *pou3f1* entraine une expression aberrante de gène de myéline malgré des niveaux normaux d'*Egr2*

Pou3f1 est un membre de la famille des facteurs de transcription qui contient le domaine Pou. Le domaine Pou est composé de deux parties, le domaine spécifique de Pou et l'homéodomaine Pou, qui se lie à l'ADN (Herr et Cleary, 1995). *Pou3f1* facilite l'induction d'*Egr2*, un facteur de transcription essentiel pour la régulation de l'expression de plusieurs protéines importantes de la myéline (Ghislain et al., 2002). Des souris n'exprimant pas *Pou3f1* présentent une activation retardée d'*Egr2*, des études récentes ont montré que *Pou3f1* peut agir en synergie avec *Sox10* pour induire *Egr2* (Ghazvini et al., 2002 ; Ghislain et Charnay, 2006). La qRT-PCR a montré des niveaux d'ARNm d'*Egr2* similaire dans les nerfs *Cond Pou3f1 : MPZ (Cre)* comparé aux contrôles. Il a été mesuré les niveaux de MPZ (myelin structural proteins) et de MBP, parce que *Pou3f1* agit comme un répresseur transcriptionnel de ces promoteurs (Monuki et al., 1993). Les nerfs *Cond Pou3f1 : MPZ (Cre)* contenaient des niveaux bas d'ARNm de MPZ, de MBP et de PMP22 comparé avec les nerfs contrôles alors que les niveaux de Nab2 et de la periaxine restent inchangés. Pour confirmer ces résultats, une infection de cellules de Schwann de rat a été faite avec des adénovirus exprimant *Pou3f1* et stimulé l'expression de gène de la myéline par ajout de 6 μ M de forskolin au milieu et quantifier le niveau d'ARNm d'*Egr2*, MPZ

et de PMP22. Il a aussi été trouvé qu'une surexpression de Pou3f1 n'entraîne pas une augmentation du niveau d'ARNm de Egr2. Cependant, il n'en résulte pas une réduction du niveau d'ARNm de MPZ et de PMP22. L'ensemble de ces résultats sont cohérents avec les résultats antérieurs désignant Pou3f1 comme un répresseur transcriptionnel de MPZ et de MBP, indiquant que les défauts primaires chez les souris condPou3f1 : MPZ (Cre) ne sont pas une expression anormale du complexe Egr2/Nab2 mais plutôt que l'expression constitutive de Pou3f1 inhibe l'expression de multiples protéines myéliniques qui entraînent alors une formation aberrante de myéline.

a. Régénération du nerf et facteur de transcription

La capacité des neurones sensitifs du système nerveux adulte à subir une récupération fonctionnelle et anatomique après une lésion nerveuse est due en partie à une bonne activation des voies transcriptionnelles de régulation. Des études *in vitro* ont montré que le facteur de transcription sox11 qui est hautement exprimé dans les neurones sensitifs en développement, est un composant important de ce contrôle de programme transcriptionnel régénératif.

Le facteur de transcription Sox11 est un membre du groupe C de la famille des facteurs de transcription de haute mobilité, qui comprend aussi Sox4 et Sox12 (Azuma et al., 1999; Dy et al., 2008 ; Hargrave et al., 1997; Wright et al., 1993). Les protéines du groupe C sont exprimées au cours du développement du système nerveux et constitue un des sept sous-groupes de séquences homologues de la famille Sox (Bergsland et al., 2006; Wegner et Stolt, 2005). L'expression du gène Sox est régulée temporellement au cours du développement (Gubbay et al., 1990; Wilson et Koopman, 2002; Wright et al., 1993) et tous semblent avoir des rôles cruciaux dans la croissance embryonnaire (Wegner et Stolt, 2005). Les facteurs Sox peuvent activer ou réprimer la transcription de gènes cibles et être à l'origine de chevauchement d'expression dans beaucoup de cas. Par exemple, au cours de la croissance de souris, Sox11 aussi bien que Sox4 sont nécessaires pour l'expression du gène Tuj1 (Bergsland et al., 2006). Ce chevauchement, couplé à la létalité embryonnaire ou périnatale dans des modèles de délétion de gène a permis de comprendre le rôle fonctionnel des facteurs Sox (Cheung et al., 2000 ; Sock et al., 2004).

En plus de leur rôle au cours du développement, certaines protéines Sox modulent la réponse à une lésion du nerf adulte. Par exemple, l'expression élevée de Sox18 dans les cellules épithéliales a une corrélation avec la régénération capillaire après une lésion (Darby et al., 2001). De même, les souris KO pour sox15 présentent une perturbation de la régénération des

muscles (Meeson et al., 2007) et une expression élevée de Sox5, 6 ou 9 importantes pour la guérison de fracture d'os (Uusitalo et al., 2001). Sox11 est exprimé à un niveau élevé dans les neurones sensitifs en développement et régulerait la maturation neuronale (Hargrave et al., 1997). Son expression est significativement réduite au cours de la phase tardive de la gestation et reste normalement à un niveau bas dans les neurones adultes.

D. La signalisation neuro-gliale et la protection de la fonction des axones par les cellules de Schwann

La coexistence des cellules gliales et des neurones est une fonction caractéristique de tous les systèmes nerveux supérieurs et présentent une évolution conservée. Chez les invertébrés comme la drosophile, les cellules gliales de type « rudimentaires » couvrent les cellules nerveuses et servent de barrière de diffusion (Klamt et al., 2001 ; Nave et Trapp, 2008). Comme les systèmes nerveux augmentent progressivement en taille, le nombre de cellules gliales augmentent et sont enfin plus nombreux que les neurones. L'augmentation du poids du corps et le besoin de réaction rapide conduit à l'évolution de la glie myélinisante. Ils développent dans des cellules hautement spécialisées qui entourent les axones avec de multiples couches qui permettent la conduction saltatoire de l'influx nerveux. Certains types de cellules gliales d'invertébrés fonctionnent avec des cellules de Schwann non myélinisantes des vertébrés, ils encerclent plusieurs fibres sans former de myéline. Ceci suggère que la fonction axonale et son intégrité à long terme est une fonction fondamentale des cellules de Schwann indépendamment de la myélinisation (Nave et Trapp, 2008). La nature de ce soutien glial n'est pas encore bien comprise. Dans le système nerveux périphérique des vertébrés, les axones recrutent les cellules de Schwann pour la myélinisation et l'enroulement de la gaine. Au cours du processus de myélinisation, l'équilibre entre la quantité de protéines de myéline et les lipides est capital comme les mutations entraînant la surexpression de protéines de myéline à l'origine de maladies neuropathiques comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth type 1A (CMT1A) (Meyer Zu Hörste et al., 2006). Les études sur des mutants de souris ont identifié le facteur de croissance neuronal NRG1 comme un régulateur majeur de la différenciation de la glie et la myélinisation (Michailov et al., 2004; Taveggia et al., 2005; Birchmeier et Nave, 2008). Récemment le contrôle des niveaux de cholestérol dans les cellules de Schwann est apparu comme un nouveau mécanisme de régulation qui coordonne la biosynthèse des protéines et des lipides au cours de la myélinisation (Pertusa et al., 2007; Saher et al., 2009). La compréhension

du réseau de signalisation impliqué dans la communication des neurones et les cellules de Schwann peut aider à comprendre le mécanisme des maladies (neuropathies périphériques).

VI. Les siARN : ROLE ET MECANISME D’ACTION

L’ARN interférence est un phénomène naturel, un mécanisme de séquence spécifique pour le silençage de gène. Sa découverte chez le nématode *C.elegans* (Fire et al., 1998) a fait l’objet du prix Nobel 2006 de physiologie/ médecine. Cependant, il est bientôt devenu évident que l’ARNi, bien qu’un peu compliqué, existe aussi chez les organismes supérieurs incluant les mammifères. L’ARNi repose sur un processus intracellulaire à plusieurs étapes, qui peuvent être globalement divisés en phase d’initiation et effectrice. Au cours de la phase effectrice, qui représente le mécanisme réel de l’ARN interférence, des molécules double brins d’ARN de 21-23 bp (small interfering RNAs, siRNAs), sont incorporés dans le complexe d’induction du silençage de l’ARN (Hammond et al., 2000). A partir de la complexation de l’ATP à travers l’activité de l’ARN hélicase au sein du brin unique (Nykanen et al., 2001), le RISC activé se lie à la molécule d’ARNm cible (Martinez et al., 2002 ; Nykanen et al., 2001). Ce processus est médié à travers l’hybridation de la séquence spécifique de l’ARN au site de la molécule d’ARNm cible et entraîne le RISC à la proximité de la molécule de l’ARNm cible, qui est alors clivé par le nucléase Argonaute 2 du RISC et est rapidement dégradé à cause maintenant de l’absence de protection (Liu et al., 2004 ; Rand et al., 2004 ; Rivas et al., 2005). Depuis la découverte de RISC dans le rôle des siARN, elle représente un processus catalytique entraînant une réduction sélective dans des molécules spécifiques d’ARNm dont le résultat est une expression réduite du gène cible. Le mécanisme démontre aussi le rôle central des molécules de siARN en initiant l’ARNi et établi l’administration des molécules de siARN pour une induction d’ARNi (Elbashir et al., 2001a,b).

A. L’induction de l’ARNi : la phase d’initiation

Naturellement ou dans un cadre expérimental ou thérapeutique, les siARN peuvent être directement ou des molécules « précurseurs » introduites dans les cellules cibles à travers différentes stratégies. Ceci inclut une administration virale ou non virale d’ADN, qui sont transcrits en molécules double brins d’ARN. Dans ce qui est appelé la phase d’initiation, ces ARN double brins sont clivés en siARN par le complexe multi-protéique Dicer, qui contient un

domaine hélicase N terminal, une liaison d'ARN appelé domaine Piwi/Argonaute/Zwille (PAZ), deux domaines de RNase III et un domaine de liaison de l'ARN double brin (Bernstein et al., 2001; Collins et Cheng 2005). Des systèmes commerciaux disponibles permettent d'explorer ce mécanisme en produisant des construits de vecteurs d'ADN codant pour des shARN: la région double brin du shRNA est formée à travers la formation en épingle de cheveux et une hybridation intramoléculaire et est reconnue par Dicer, entraînant la formation d'homologues de siARN. Alternativement, les molécules de shARN peuvent être directement introduites dans les cellules, cependant, un inconvénient majeur des molécules longues double brins d'ARN est l'induction de la réponse immune cellulaire à travers l'activation du système d'interféron. La stratégie d'administration directe de molécules de siARN dans les cellules cibles évite largement ce problème, bien que certaines séquences d'interféron stimulantes soient bien. Par ailleurs, l'action de Dicer n'est pas requise (Bridge et al., 2003 ; Hornung et al., 2005 ; Sledz et al., 2003).

Des études systémiques sur des efficacités ciblantes ont montré que les siRNA optimales peuvent être déduites selon certaines règles de sélection. Ceci inclut une taille optimale de 19-25 bp avec un pourcentage de guanine-cytosine compris entre 30 et 52%, deux nucléotides symétriques 3' ainsi que d'autres nucléotides spécifiques à certaines positions. Sur la base de ces critères précédemment établis, plusieurs ordinateurs basés sur des algorithmes permettent l'identification des séquences du siARN optimal pour un gène donné. Un exemple est un logiciel de conception de siRNA «le siRNA Design Software (SDS)» de l'Université de Hong Kong qui combine les algorithmes de différentes compagnies et est accessible sur internet (<http://i.cs.hku.hk/sirna/software/sirna.php>). Néanmoins, trouver un siARN optimal requiert encore des tests approfondis. Il s'agit d'une grande efficacité ciblant, qui est aussi déterminée par des variations dans l'accessibilité de l'ARNm cible à des positions différentes ainsi que l'absence de tout effet secondaire indésirable. En fait, un silençage non spécifique de gènes dû seulement à une séquence homologue partielle a été décrit (Jackson et al., 2003). Par ailleurs, il a été montré in vivo, que certaines séquences de siARN ainsi que des molécules longues, doubles brins d'ARN activent le système immunitaire inné entraînant des effets non spécifiques dûs à une stimulation de la réponse inflammatoire (Heil et al., 2004 ; Judge et al., 2005 ; Sioud 2005 ; Sledz et al., 2003). Ce phénomène semble dépendre de la présence de séquences riches en guanine-uracile ainsi que sur la formulation et la quantité de siRNA (Heidel et al., 2004 ; Ma et al., 2005; Sioud et Sorensen 2003), et ces aspects ont besoin d'être considérés pour toute application thérapeutique in vivo de siARN.

B. L'utilisation *in vivo* de molécules de siARN

Depuis la découverte du rôle central des siARN pour induire des ARNi (Elbashir et al., 2001a,b), le rôle direct de l'application des molécules de siARN a été exploré *in vitro* et *in vivo*. *In vitro*, plusieurs réactifs de transfection permettent l'administration de siRNA dans les cellules de mammifères en présence ou en absence de sérum. Cependant, l'application *in vivo* de siARN requiert le développement de formulations plus sophistiquées et/ou l'identification de mode optimal d'administration.

Plusieurs preuves de principe d'étude ont montré l'administration de molécules de siARN couplés au fluorophore dans des organes variés (Bradley et al., 2005a,b; Pirollo et al., 2006; Sioud et Sorensen 2003). L'organe cible était souvent le foie mais des gènes cibles dans d'autres organes, dans d'autres parties du corps ou dans des tumeurs de xénogreffes ont été étudiés. Pris ensemble, ces études fournissent des informations précieuses dans l'administration et l'efficacité des siARN pour l'induction des ARNi.

C. Efficacité de la transfection *in vitro* de siARN

Le siARN forme un RISC dans le cytosol pour dégrader l'ARNm. Ainsi, le siARN peut exercer son effet de silençage de gène aussi longtemps que le siARN pénètre dans le cytosol de la cellule cible (Zheng et al., 2002). Cependant, le shRNA exprimant ADNp a besoin d'être administré dans le noyau des cellules cibles afin de transcrire le shARN qui est transporté dans le cytosol où il est traité en siARN.

L'étude de la thérapie génique a montré que l'administration au niveau du noyau des cellules cibles est un des grands défis de la transfection (Wagstaff et al., 2007). Donc, les siARN ont un grand avantage au niveau de l'efficacité d'administration comparativement aux shARN. Bien qu'il ait peu d'études comparant directement l'efficacité de la transfection de siARN et de shARN, il est à souligner que le siARN a un grand avantage en étant capable de transfecter les cellules qui prolifèrent mal dans lesquelles l'entrée de shARN dans le noyau est limitée par l'enveloppe nucléaire. Par exemple, des « knockdown » réussis de gènes cibles dans des cellules comme des cellules de la moelle épinière (Shen et al., 2004) et des cellules primaires de lymphocytes (Mantei et al., 2008) pour lesquelles la transfection avec l'ADNp est difficile à cause de la faible perméabilité de leur enveloppe nucléaire, est facile avec le siARN. Même

dans le cas des cellules tumorales, qui sont des cellules à capacité de prolifération élevée, leur enveloppe nucléaire est encore un obstacle majeur.

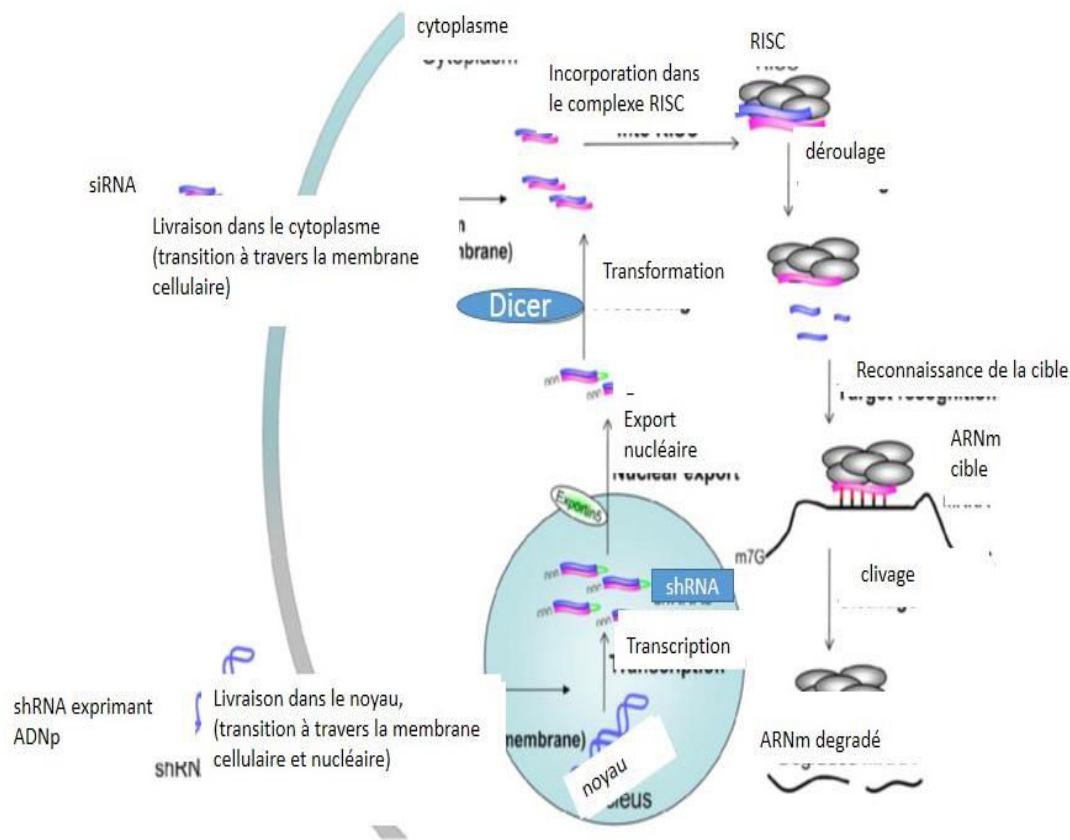


Figure 22 : Schéma de silençage de gènes par siARN et shARN. Comme l'effet de l'ARNi est limité dans les cellules qui ont des siARN, le siARN aussi bien que le shARN seraient administrés aux cellules cibles. Le shARN doit être administré dans le noyau pour être transcrit tandis que le siARN est directement administré dans le cytoplasme. Le shARN qui rejoint le noyau, transcrit de multiples shARN qui sont transportés du noyau au cytoplasme par des protéines transporteuses (exportin5). Le shARN transporté dans le cytoplasme et est converti en siARN sous l'action de Dicer. Le siARN dans le cytoplasme est incorporé dans le complexe RISC (d'après Takahashi et al., 2009).

D. Les molécules de siRNA thérapeutiques

Au delà de la détection de la régulation négative de gène cible endogène, les siARN médiés par l'ARNi dans un but thérapeutique a été exploré. Les organes cibles comprennent le foie, le rein, les poumons, l'œil.

De nouveaux outils d'évaluation de la fonction des gènes comme les ribozymes, les « DNAzymes », les ARNi apparaissent comme l'une des méthodes les plus hautement efficaces. L'ARNi assure l'induction du silençage de sequence spécifique de gène par de l'ARN double brin. Le processus par lequel l'ARN double brin induit la dégradation des transcrits homologues a été initialement décrit chez *Caenorhabditis elegans*, un ver nématode. Les ARN double brins sont traités par Dicer, une enzyme des ARN endogènes de sorte à obtenir de 21-23 nucléotides d'ARN interférence. Ces petits ARN interférences ont été premièrement trouvés chez les plantes présentant un silençage d'ARN médié par un transgène, ils guident le complexe RISC qui contient les protéines nécessaires pour le déroulement des siRNA double brins et clive l'ARNm cible. Dans les cellules de mammifère, les ARN double brins longs déclenchent la réponse des interférons qui pourraient jouer en partie le rôle de médiateur via l'activation de la protéine kinase R, une kinase qui est activée par dimérisation en présence d'ARN double brins. Cette protéine phosphoryle et inactive le facteur de traduction eIF α entraînant l'inhibition des protéines totales. Par conséquent, les ARN double brins sont considérés comme n'étant pas utiles à l'analyse de la fonction des gènes de mammifères. Cependant, après la constatation que l'expérience aux RNAi peut se faire dans les cultures de mammifère avec des siARN de 21-23 pb, ce procédé est apparu comme une stratégie efficace d'éteindre sélectivement l'expression génique de cellules de mammifères. Bien que beaucoup de progrès aient été réalisés pour démontrer l'activité des siARN chez les cellules de mammifère, l'application thérapeutique potentielle n'a pas encore été démontré *in vivo*.

E. Spécificité de l'effet des siARN

Quand bien même le silençage de gène basé sur l'ARNi est hautement spécifique, les ARNi thérapeutiques rencontrent des problèmes inattendus impliquant des mécanismes variés comme la réponse inflammatoire incluant la réponse des interférons (Robbins et al., 2008; Kleinman et al., 2008; Armstrong et al., 2008), la saturation des voies des miARN endogènes (Grimm et al., 2006 ; McBride et al., 2008) et des effets indésirables du gène cible (Takahashi et al., 2008). Ces effets indésirables peuvent être un problème significatif pour la thérapie basée sur l'ARNi.

Depuis la découverte des siARN, la réponse inflammatoire contre les siARN et leurs vecteurs est l'une des préoccupations majeures dans l'utilisation de l'ARNi car une telle réponse non spécifique peut conduire à une incompréhension des résultats obtenus par induction aux ARNi. A ce jour, il est montré que la réponse inflammatoire contre les siARN dépend d'une variété de facteurs y compris la séquence, la longueur, la quantité de siARN, la méthode de transfection et le type cellulaire (Aagard et al., 2007; Judge et al., 2008). Récemment, Kleinman et ses collaborateurs ont démontré que la suppression indépendante de la séquence et de la cible de la néovascularisation choroïdienne au cours d'une dégénérescence liée à l'âge est modélisée par des siARN (Kleinman et al., 2008). Dans leur étude, ils ont utilisé des siARN ciblant le facteur A de croissance vasculaire endothéliale (VEGFA) ou son récepteur VEGFR1 pour supprimer la progression de la néovascularisation choroïdienne. Cependant, ils ont trouvé que les siARN utilisés même les contrôles négatifs sont efficaces pour inhiber la néovascularisation choroïdienne indépendamment de leur séquence. Cette séquence d'inhibition non spécifique était médiée par la reconnaissance des siRNA par les TLR3. Robbins et ses collaborateurs ont montré que le siRNA immunostimulant peut exercer un effet qui est indépendant du gène cible (Robbins et al., 2008). En utilisant des siRNA chimiquement modifiés qui n'ont aucun effet immunostimulant, ils ont montré que l'effet antiviral du siRNA contre influenza in vivo n'était pas dû à la dégradation spécifique de la séquence de l'ARN viral mais principalement dû à l'effet immunostimulant. Par conséquent, ces études montrent la nécessité d'anticiper, de surveiller et de préparer des contrôles adéquats pour la stimulation immunitaire par médiation de siARN et qu'une prudence est nécessaire pour l'interprétation des résultats des RNAi thérapeutiques in vivo. En ce qui concerne le vecteur d'ADN plasmidique, l'effet sur l'induction de l'ARNi n'a pas été observé bien que la réponse inflammatoire induite par le motif CpG/TLR9-dépendant et des mécanismes des motifs CpG indépendants pourrait affecter l'effet de l'ARNi (Spies et al., 2003; Yasuda et al., 2004; Cornélie et al., 2004; Yoshida et al., 2008). Lorsque l'ARNi est utilisé pour traiter des cancers ou des maladies infectieuses, la réponse immunitaire innée en réponse à l'effecteur d'ARNi serait bénéfique pour obtenir des effets thérapeutiques. En ce qui concerne le vecteur viral pour l'ARNi, des décès chez la souris dus à une saturation des voies de miARN par une expression à long terme ont été observés en utilisant des vecteurs d'adénovirus type 8 exprimant shARN (Grimm et al., 2006). Une surexpression de l'exportin-5 ou Dicer, deux molécules importantes dans la transformation de shARN/miARN accélère cette transformation entraînant des effets élevés de « knock-down » (Mikuma et al., 2004 ; Yi et al., 2005). Des transfections par des shARN entraînent une accumulation d'une grande quantité de shARN immatures dans les cellules (Boudreau et al., 2008). Comme la

surexpression de shARN inhibe de manière compétitive sa transformation intracellulaire, ceci pourrait entraîner des effets secondaires toxiques (Grimm et al., 2006; McBride et al., 2008), la saturation de la voie de shARN/miARN devrait être surveillée soigneusement lorsque des shARN sont utilisés. Même si l'ARNi est induit avec succès sans aucun effet aspécifique, le silençage d'une cible spécifique de gène pourrait entraîner des effets indésirables. La β -caténine régule l'activité de certains facteurs de transcription comme les facteurs des cellules T/ facteur enhancer des lymphoïdes dans la voie de la β -caténine qui activent la transcription de gènes liés à la croissance et à la survie cellulaire. La β -caténine joue un rôle important comme oncogène pour promouvoir la croissance des cellules tumorales. L'inhibition de l'expression de la β -caténine dans les cellules tumorales entraîne celle de la croissance tumorale (Takahashi et al., 2006 ; Verma et al., 2003 ; Huang et al., 2007; Pu et al., 2008). Cependant, des études récentes utilisant des shARN ont permis de montrer que le silençage de l'expression du gène de la β -caténine favorisait la métastase pulmonaire des cellules de melanome malgré le fait qu'il supprime la croissance du tissu tumoral primaire (McBride et al., 2008). D'autres études suggèrent que le silençage de l'expression du gène de la β -caténine favorise les métastases pulmonaires en augmentant la dissociation cellulaire à partir du tissu tumoral primaire et la mobilité cellulaire en réduisant la quantité de protéine de cadherine, une molécule d'adhésion cellulaire qui s'associe au β -caténine dans les cellules tumorales. Ces résultats soulèvent une préoccupation sérieuse pour l'utilisation de la suppression de l'expression de la β -caténine dans les cellules tumorales comme un traitement anticancéreux, parce que le peu de cellules survivants après le traitement sont susceptibles de devenir plus malignes dans la mesure où leurs propriétés métastatiques sont conservées. Des résultats similaires peuvent être observés avec d'autres gènes cibles.

PARTIE II : PHYSIOPATHOLOGIE DU SYSTEME NERVEUX PERIPHERIQUE

I. MYELINE ET NEUROPATHIES PERIPHERIQUES HUMAINES

A. GENERALITES SUR LES NEUROPATHIES PERIPHERIQUES

1. Aperçu sur les différentes appellations des différents types de neuropathies périphériques

Par définition, le système nerveux périphérique inclut les neurones moteurs et sensitifs des nerfs crâniens et des nerfs périphériques sensitifs et moteurs, les racines, les plexus et les troncs nerveux périphériques jusqu'à leurs ramifications terminales intramusculaires, ainsi que le système nerveux autonome. Les neuropathies périphériques sont donc des affections correspondant à la souffrance d'une ou plusieurs de ces structures. Une atteinte diffuse et relativement symétrique correspond à une polyneuropathie, et si les racines sont également concernées, à une polyradiculoneuropathie ; si les lésions sont limitées à un seul tronc nerveux, on parle de mononeuropathie. Une mononeuropathie multiple correspond à l'atteinte parfois successive ou simultanée et donc asymétriques de plusieurs troncs nerveux. Il est désormais habituel de préférer ces dénominations à celles de polynévrite, mononévrite ou multinévrite. On dénomme une atteinte isolée d'une ou de plusieurs racines, radiculopathie et d'un plexus, plexopathie. Ce diagnostic de répartition qui repose essentiellement sur la clinique mais aussi sur l'étude électrophysiologique n'a pas qu'un intérêt sémiologique, il permettra souvent d'orienter le diagnostic étiologique.

Ces atteintes neuropathiques entraînent le plus souvent des signes fonctionnels et déficitaires sensitivomoteurs, compte tenu de l'étroite intrication des fibres motrices et sensitives dans la plupart des troncs nerveux. Néanmoins, les concepts de neuropathie purement motrice et purement sensitive sont parfaitement admis étant entendu qu'ils sont utilisés en fonction des manifestations fonctionnelles et cliniques, mais qu'il n'y a pas toujours une corrélation de la constatation d'une atteinte sélective des fibres motrices ou sensitives, à l'examen électrophysiologique. Le terme « neurone » inclut corps cytoplasmique et axone. Si la lésion siège primitivement au niveau des axones, que ce soit à la partie proximale ou distale, il est plus exact d'utiliser la terminologie de neuropathie par axonopathie sensitivomotrice. Au cas où, en revanche, c'est le corps cytoplasmique qui est lésé en premier, les troubles peuvent être uniquement moteurs ou sensitifs et il est habituel d'utiliser le terme de ganglionopathie ou de neuronopathie.

En pratique, de façon discutable, on a tendance à séparer les maladies du motoneurone des neuropathies périphériques. Le terme de neuropathie motrice est relativement imprécis car des atteintes des motoneurones, des racines antérieures ou de certains troncs nerveux essentiellement moteurs seront regroupées sous le même vocable. Les neuropathies sensitives, elles, peuvent être en rapport avec une atteinte sélective des fibres sensitives ou au moins de

façon initiale avec une atteinte neuronale des ganglions rachidiens postérieurs, ces derniers cas sont nommés neuropathies sensitives alors que curieusement une atteinte isolée des motoneurones est considérée comme étant une maladie spinale et est exclue par convention discutable du diagnostic des neuropathies périphériques. Cette anomalie pourrait simplement tenir au fait que les motoneurones sont situés dans la moelle épinière, alors que les neurones sensitifs des ganglions rachidiens postérieurs sont extramédullaires. Il est sûr que toute perturbation du neurone, qu'il soit moteur ou sensitif, que ce soit au niveau du corps cytoplasmique ou de l'axone, dans ses parties les plus distales ou les plus proximales, se répercute à quelque niveau que ce soit du neurone.

2. Dans quel cas affirmer une neuropathie

Il n'est pas habituellement difficile d'affirmer qu'un sujet présente des symptômes cliniques d'une neuropathie périphérique lorsque les déficits sensitivomoteurs associés à une aréflexie ostéotendineuse sont présents. On peut néanmoins souligner quelques circonstances plus difficiles :

- Les neuropathies motrices pures qui peuvent poser un problème diagnostique avec une amyotrophie spinale;
- en cas de symptômes essentiellement subjectifs, limités aux membres inférieurs, doit être discuté un syndrome compressif des racines lombaires par exemple par arthrose, chez le sujet âgé;
- s'il s'agit d'une atteinte pure des petites fibres myélinisées et/ou des fibres amyéliniques, il peut y avoir qu'un minimum de signes objectifs, les reflexes ostéotendineux sont présents.

On ne peut compter sur l'étude électrophysiologique classique (qui ne permet que l'exploration des grosses fibres myélinisées) pour confirmer la neuropathie, si bien que d'autres diagnostics peuvent être évoqués, comme des manifestations purement névrotiques.

3. Les types lésionnels

Il est habituel de distinguer les atteintes démyélinisantes des atteintes axonales, un nombre significatif de cas, présentant des atteintes mixtes. Cette atteinte n'est pas uniquement physiopathologique mais permettra d'orienter le diagnostic étiologique. C'est ainsi que des causes carentielles, l'alcoolisme, les chimiothérapies anticancéreuses etc. seront responsables

de neuropathies axonales. En revanche, une neuropathie d'évolution chronique, apparemment primitive, dont l'étude électrophysiologique objective des blocs de conduction multiples, doit conduire à rechercher des éléments susceptibles de confirmer une polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique (PIDC).

4. Neuropathies démyélinisantes

Au cours des polyradiculonévrites inflammatoires démyélinisantes chroniques, le déficit le plus souvent moteur prédomine au niveau des muscles proximaux et n'est pas en rapport avec une atteinte « longueur-dépendante » ; la démyélinisation segmentaire se fait au hasard, mais débute dans les zones où l'infiltrat inflammatoire est le plus marqué, à la partie proximale du système nerveux périphérique, c'est-à-dire les racines. L'antigène précis déclenchant les formes aiguës comme le syndrome de Guillain-Barré (SGB) de même que les polyradiculonévrites inflammatoires démyélinisantes chroniques reste inconnu ; il s'agit de neuropathie périphérique dont le mécanisme auto-immun est admis. Dans certains cas de syndrome de Guillain-Barré, un mécanisme de mimétisme moléculaire est fortement évoqué comme élément déclenchant : *Campylobacter jejuni* infecte le sujet dont le système immunitaire réagit contre les membranes de ce germe qui partage des éléments constitutifs identiques de la membrane de la cellule de Schwann : les glycolipides. La mise en évidence d'une démyélinisation homogène sans bloc de conduction oriente plutôt vers une neuropathie héréditaire comme la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT). Il existe actuellement plus d'une quinzaine de gènes connus dont les mutations sont considérées comme responsables d'un dysfonctionnement de la cellule de Schwann, cellule myélinisante du système nerveux périphérique. En pratique, cette règle peut subir des exceptions et il a été décrit des cas de CMT dont la démyélinisation sur le plan électrophysiologique était très hétérogène et avait fait évoquer à tort le diagnostic de polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique.

5. Neuropathie axonale

Au cours des axonopathies, l'atteinte des fibres nerveuses les plus longues explique le début distal habituel aux membres inférieurs. L'atteinte débute ainsi à l'extrémité distale de la fibre nerveuse et la dégénérescence remonte de façon centripète vers le corps cellulaire. Si le processus causal se maintient, la dégénérescence axonale se poursuit et va intéresser les fibres nerveuses de plus en plus courtes. Il en est ainsi pour certaines polyneuropathies diabétiques,

alcoolocarentielles et amyloïdes qui touchent les fibres myélinisées de petit diamètre et amyéliniques. Les troubles sensitifs observés dans ces cas intéressent les quatre membres, les trois quarts inférieurs de la face antérieure du tronc en « tablier », la région perianale et le sommet du crâne en « calotte ».

En réalité, seules les neuropathies aiguës entraînent des lésions purement démyélinisantes et purement axonales en fonction de la cause ; en effet, il faut souligner que myéline et axone forme un couple indissociable.

a. Forme sensitive pure

La présence de l'atteinte de tel ou tel type de fibres peut être un élément d'orientation étiologique.

- **Lésions des petites fibres**

Le déficit sensitif est limité aux sensibilités thermiques et douloureuses accompagné d'une atteinte modérée de la sensibilité tactile ; les sensibilités épicrotite et proprioceptive sont intactes. Il existe donc une perturbation dissociée des sensibilités de type syringomyélique. L'atteinte très souvent concomitante des fibres amyéliniques se traduit aussi par une dysautonomie. Ce type de neuropathie périphérique sensitive est plus particulièrement rencontré au cours du diabète, de l'amylose, de la lèpre ; plus rarement il s'agit de certaines formes de neuropathies périphériques sensibles héréditaires, des neuropathies périphériques alcooliques, carentielles. La plupart a l'aspect de neuropathies périphériques axonales distales « longueur-dependante ». Néanmoins, l'examen de la biopsie nerveuse de certains de ces patients n'est pas toujours conforme à cette atteinte sélective supposée des petites fibres.

- **Lésions des grosses fibres myélinisées**

Les manifestations cliniques sont en particulier une aréflexie ostéotendineuse diffuse, un signe de Romberg, des troubles sensitifs proprioceptifs et assez fréquemment un tremblement des extrémités. Trois types de neuropathies périphériques peuvent présenter de tels symptômes : celles par atteinte axonale, les neuropathies périphériques par atteinte myélinique et celles par lésion du ganglion rachidien postérieur (ganglionopathie ou neuronopathie). Les plus fréquentes sont les deux derniers types. Les neuropathies périphériques démyélinisantes sont essentiellement celles associées à une dysglobulinémie de type immunoglobuline (Ig) M ayant une activité anti *myélin associated glycoprotein* (MAG). Les neuronopathies correspondent aux atteintes paranéoplasiques de type Denny-Brown, ainsi qu'à certaines intoxications par la vitamine B6 ou certaines chimiothérapies comme le cisplatine.

b. Formes motrices pures

Il faut souligner le tableau très particulier de certaines neuropathies motrices pures accompagnées de fasciculations, de crampes, d'amyotrophie, débutant souvent aux membres supérieurs de façon asymétriques et en rapport avec des blocs de conduction multiples sur les fibres motrices. Il s'agit de cas rares, souvent associés à la présence d'anticorps anti-GM1 et pour lesquels doit être proposé un traitement par immunoglobuline en perfusions.

6. Examens complémentaires en cas d'un tableau clinique de neuropathie périphérique

a. Examen électrophysiologique

Il sera utile dans un nombre significatif de cas à la condition qu'il soit effectué de façon systématique et complète, par un neurologue qui connaît l'histoire clinique du malade et l'aura examiné au préalable. Il pourra être nécessaire de le répéter et le compléter éventuellement par un examen des potentiels évoqués. Dans la plupart des cas, il permettra de confirmer l'atteinte tronculaire et de préciser le type lésionnel. Il a néanmoins ses limites : constatation d'un ou plusieurs troncs nerveux instimulables dont on ne pourra préciser le type lésionnel, peu d'anomalies s'il s'agit d'une atteinte isolée des petites fibres ; en cas de constatation de lésions de type axonal, sévères et anciennes, il sera souvent difficile d'indiquer si le processus pathologique initial était éventuellement démyélinisant.

b. Examen biologique

Hormis les examens de routine, en fonction des constatations cliniques et électrophysiologiques, il pourra être utile de demander un dosage des anticorps antiglycolipides et anti-MAG. Il faut souligner que devant une neuropathie démyélinisante chronique qui ne fait pas sa preuve, qu'elle ait ou non des caractères cliniques, électrophysiologiques d'une polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique, il est souhaitable de ne pas éliminer par principe une neuropathie génétiquement induite, atypique, raison pour laquelle il est souhaitable de stocker de l'ADN du patient ; en fonction du phénotype clinique et éventuellement histologique, la recherche d'une anomalie de tel ou tel gène impliqué dans les neuropathies héréditaires sera demandée.

7. Biopsie nerveuse

Les indications de cette biopsie ne sont pas actuellement faciles à préciser. Elle reste très performante pour affirmer certains diagnostics comme la périarthrite noueuse en y associant une biopsie musculaire pour augmenter les chances d'en trouver les lésions spécifiques. Elle peut être préconisée en vue d'affirmer un diagnostic de polyradiculonévrite inflammatoire démyélinisante chronique atypique, de préciser le mécanisme d'une neuropathie associée à une dysglobulinémie monoclonale. Dans le contexte d'une neuropathie génétique, la responsabilité de 15 gènes est actuellement connue ; c'est dire que devant une forme apparemment sporadique, aucun laboratoire ne peut actuellement étudier l'ensemble de ces gènes, et la biopsie nerveuse est de ce fait susceptible, en fonction des lésions morphologiques d'orienter particulièrement vers tel ou tel gène.

Dans le contexte d'une neuropathie de cause apparemment inconnue, la biopsie nerveuse peut parfois objectiver des anomalies inattendues, telles que des dépôts amyloïdes, ce qui a une conséquence majeure en terme de conseil génétique.

8. Enquête étiologique

Plusieurs facteurs seront déterminants dans la recherche de l'étiologie d'une neuropathie périphérique : le contexte au sens large, les modalités d'installation des troubles et leur évolution, la distribution topographique des signes cliniques, le type de fibres atteintes, le type lésionnel en cause étudié par l'examen électrique et si besoin par la biopsie nerveuse.

Dans certains cas, il peut être presque certainement incriminé, ceci d'autant que les signes cliniques de l'atteinte neuropathique sont compatibles avec cette étiologie possible : survenue d'une polyneuropathie sensitive chez un diabétique mal équilibré depuis longtemps, d'une mononeuropathie multiple chez un patient suivi pour un collagénose, d'une polyneuropathie chez un sujet sous chimiothérapie anticancéreuse etc. Des antécédents connus et divers peuvent être responsables de neuropathie périphérique. Il n'en est pas moins vrai que trouver un lien de cause à effet ne sera pas toujours facile : une polyneuropathie chez un alcoolique peut être en réalité d'une autre cause que l'alcoolisme ; la constatation d'une dysglobulinémie peut être fortuite etc. De plus, chez un même patient, sont parfois constatés plusieurs facteurs susceptibles d'être responsables de la neuropathie. Malgré le tableau clinique, le mode évolutif,

le type lésionnel ainsi que les résultats des examens complémentaires aussi complets soient-ils, il sera parfois impossible de conclure et de déterminer avec certitude l'imputabilité de telle ou telle cause. En l'absence de tout contexte évocateur, il s'agit d'une neuropathie révélatrice et inaugurale. Un grand nombre de causes sont alors à évoquer qui pourront d'ailleurs n'apparaître qu'ultérieurement au cours de l'évolution. Le recueil d'informations souvent simples est susceptible d'orienter le diagnostic. L'âge : chez l'enfant, les polyneuropathies sont dominées par les causes génétiques et avec une moindre fréquence les polyneuropathies inflammatoires. Récemment, chez le nourrisson a été décrite une forme très particulière de neuropathie axonale grave infantile avec insuffisance respiratoire (SMARD), tous ces enfants ont des problèmes respiratoires qui apparaissent pendant les six premiers mois de vie, ils doivent tous être ventilés et le plus souvent décèdent au cours des deux premières années. L'hérédité est autosomique récessive. Il peut être difficile de différencier cette neuropathie d'une amyotrophie spinale type Werdnig-Hoffmann. Chez le sujet âgé, on rencontre un nombre significatif de polyneuropathies d'étiologies difficiles à préciser : il s'agit souvent de neuropathies considérées comme des atteintes axonales chroniques isolées, dont certaines pourraient en fait correspondre à des polyradiculonévrites inflammatoires démyélinisantes chroniques évoluées avec atteinte axonale sévère qui masque la démyélinisation initiale. L'origine ethnique et géographique est importante à considérer pour envisager le diagnostic de lèpre ou de maladie de Lyme.

- La profession ou des occupations annexes peuvent faire soupçonner l'existence de polyneuropathies toxiques.
- . L'enquête familiale est extrêmement utile dans le contexte d'une polyneuropathie chronique isolée. L'interrogatoire n'est pas toujours suffisant et il ne faut pas craindre de suggérer examens cliniques et électrophysiologiques systématiques des autres membres de la famille, même s'il n'y a pas de plainte fonctionnelle. La notion de consanguinité est à rechercher systématiquement.

A. LES DIFFERENTS TYPES DE NEUROPATHIES

1. LES NEUROPATHIES HEREDITAIRES : CAS PARTICULIER DE LA MALADIE DE CHARCOT MARIE TOOTH

a. GENERALITES

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) ou neuropathie héréditaire sensitive et motrice comprend un groupe de neuropathies héréditaires hétérogène sur le plan clinique et génétique. La CMT est le trouble neuromusculaire héréditaire le plus connu avec une prévalence comprise entre 17 et 40 pour 100 000 individus. De nos jours, plus de 30 loci et environ 20 gènes responsables sont associés à l'apparition de la maladie (<http://www.molgen.ua.ac.be/CMTMutations/>; <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/time/hmsn.html>). Les caractéristiques cliniques de la maladie comprennent une faiblesse musculaire distale progressive et une atrophie commençant par les membres inférieurs puis atteignant plus tard les extrémités supérieures, des déformations des pieds, une perte sensitive distale et une diminution ou absence des reflexes des tendons (Harding et Thomas, 1980). Les neuropathies héréditaires sont classées en neuropathies mixtes sensibles et motrices si la faiblesse musculaire est prédominante avec de légers déficits sensitifs, en neuropathie motrice héréditaire distale si le déficit moteur est dominant et en neuropathie héréditaire sensitive ou en neuropathie héréditaire sensitive et autonome si les déficits sensitifs et/ou les dysfonctionnements autonomes sont prédominants (Dyck et al., 1993). En fonction des critères électrophysiologiques, la neuropathie héréditaire sensitive et motrice est classée en deux principales sous-groupes : le type démyélinisant (CMT1) qui est une neuropathie essentiellement démyélinisante avec une vitesse de conduction du nerf moteur fortement réduite (<38m/s) et le type axonal CMT2 avec une perte principalement axonale caractérisée par une conduction normale ou légèrement réduite du nerf (>38 m/s) mais avec des amplitudes décroissantes (Dyck et al., 1993). Des subdivisions additionnelles au sein de ces deux types sont faites sur la base du mode de transmission et des résultats des investigations génétiques moléculaires.

La transmission de la maladie de Charcot-Marie-Tooth peut être autosomique dominante (AD), liée à X ou autosomique récessive (AR). Les études histopathologiques de la CMT1 montre une démyélinisation segmentaire et une remyélinisation avec une formation importante en bulbe d'oignon et une dégénérescence axonale avec repousse régénérative dans la CMT2 (Schröder et al., 2001).

Lorsqu'il existe un contexte de transmission dominante ou une notion de consanguinité, affirmer le diagnostic clinique de CMT n'est pas difficile. L'étude électrophysiologique orientera vers le mécanisme lésionnel en cause, démyélinisant ou axonal ou éventuellement de type intermédiaire.

Déterminer l'anomalie génique est plus difficile. En présence d'un CMT manifestement dominant et démyélinisant, il est désormais simple de rechercher une anomalie des gènes

PMP22 ou P0. Dans le cas d'une atteinte de type intermédiaire ou même axonale dominante, s'il n'y a pas de transmission père-fils, une mutation du gène de la connexine 32 sera à rechercher ; néanmoins, il peut aussi s'agir d'atteintes de type démyélinisant.

Quelles que soient les modalités de transmission, si le cas est apparemment sporadique, l'analyse de biologie moléculaire est beaucoup plus complexe. Certains éléments permettent d'orienter la mise en évidence de l'anomalie génétique en cause : les formes récessives ont presque toujours un phénotype comme il a déjà été indiqué ; la biopsie nerveuse peut, dans certains cas, par la mise en évidence d'anomalies morphologiques très évocatrices, orienter cette recherche. L'affirmation de la mutation d'un gène est évidemment très utile dans le cadre de l'information génétique. Compte tenu du nombre de gènes en cause, de l'intrication des mécanismes lésionnels, des modalités de transmission, la classification actuelle de la maladie de CMT est extrêmement complexe. Il faut aussi souligner que les fonctions des gènes anormaux sont actuellement très mal connues. Pourtant la mondialisation, les migrations de populations rendent de plus en plus indispensable une meilleure approche de la connaissance de ces neuropathies héréditaires.

Enfin, un phénotype CMT peut en fait correspondre à une neuropathie à axones géants ; certains de ces cas ont une mutation du gène de l'affection en cause, la gigaxoxine, alors que d'autres ne l'ont pas, ce qui complique encore le diagnostic.

b. CMT1 : dominante et démyélinisante

La CMT1A est due à la présence en triple exemplaire du gène PMP22 entraînant une surproduction de protéines nuisant au fonctionnement des nerfs périphériques. Elle apparaît avec une fréquence de 1 pour 5000 individus et compte pour 60-90% des patients de la CMT1 et 40-50% de tous les patients de CMT (Nelis et al., 1996 ; Boerkoel et al., 2002). L'apparition de la CMT1A est associée à une duplication du chromosome 17p11.2-p12 contenant 98% du gène de la protéine de la myéline périphérique 22 (Raeymaekers et al., 1989 ; Vance et al., 1989) et moins fréquemment (2%) lié à des mutations ponctuelles de PMP22 (Valentijn et al., 1992). 1/5 des patients présentent une mutation de *novo*. La protéine PMP22 joue un rôle dans la myélinisation et la régulation de la croissance et de la différenciation cellulaire (Martini et Schachner, 1997 ; Adlkofer et al., 1997). L'augmentation du dosage du gène PMP22 affecterait la dégradation intracellulaire de composants de différentes membranes. La CMT1A est caractérisé par une apparition précoce, généralement dans l'enfance, un phénotype type CMT et se présente comme une maladie bénigne. Cependant, la gravité de la maladie est très variable

même au sein d'une même famille. L'hypertrophie nerveuse peut être observée dans environ 25% des patients de CMT1A (Shy et al., 2005) et la perte auditive due à une atteinte du nerf acoustique peut concerner jusqu'à 5% des patients (Birouk et al., 1997). Les vitesses de conduction du nerf moteur et sensitif sont nettement ralenties de manière homogène, uniforme et diffuse sans signe de bloc de conduction contrairement aux polyneuropathies inflammatoires acquises. La vitesse de conduction nerveuse motrice obtenue dans la plupart des patients de CMT1A est comprise entre 15 et 30 m/s. La réduction de la vitesse de conduction du nerf moteur apparaît précocement et est complètement établie à l'âge de 3 ou 5 ans. La gravité de la CMT1A est directement corrélée avec la diminution de l'amplitude des potentiels d'action du nerf moteur avec la disparition des potentiels d'action du nerf sensitif mais pas avec le ralentissement de la conduction nerveuse (Pareyson et al., 2006). La réduction de la vitesse de conduction peut être aussi observée au niveau des nerfs craniens (n.VII et VIII) (Pareyson et al., 2000). La CMT démyélinisante de même que la CMT axonale, au cours de la maladie entraîne une perte axonale et une diminution de l'amplitude des potentiels d'action du nerf moteur et sensitif. La diminution de la vitesse de conduction du nerf moteur pourrait se présenter comme le résultat de dysfonctionnement des nœuds, des paranœuds ainsi des canaux ioniques (Capasso et al., 2004). La CMT1B est causée par des mutations dans le gène de la protéine zero de la myéline (MPZ ou P0) situé sur le chromosome 1q22-q23 (Hayasaka et al., 1993b). Les mutations au sein du gène MPZ comptent pour moins de 5% des cas de CMT1 (Nelis et al., 1996). Plus de 100 mutations du gène MPZ sont connues, la plupart d'entre elles sont des mutations faux sens mais des mutations non sens et des changements de cadre de lecture ont aussi été trouvés. MPZ est la protéine la plus abondante de la myéline périphérique et agit comme une molécule d'adhésion qui assure la connexion des lamelles de myéline, nécessaire pour une structure et un fonctionnement normal de la myéline (Martini et Schachner, 1997). Une protéine anormale de MPZ pourrait affecter l'interaction cellule de Schwann/neurone résultant en une myélinisation défectueuse des nerfs périphériques (Niemann et al., 2006). La plupart des mutations de MPZ donne un phénotype classique de CMT1 avec une apparition au cours de la première décennie, une faiblesse musculaire distale progressive et une perte sensitive. Cependant, certaines mutations entraînent la forme la plus sévère du syndrome de Dejerine-Sottas (DSS) ou la neuropathie congénitale hypomyélinisante (CHN) (Nelis et al., 1999). Des mutations spécifiques de MPZ sont associées à la CMT2. Les caractéristiques électrophysiologiques de la CMT1B correspondent au phénotype classique de CMT1. Cependant, des blocs de conduction ont été rarement observés dans ce type B de la CMT1. Les patients avec une atteinte précoce de la maladie peuvent avoir une diminution très poussée de

la vitesse de conduction nerveuse du nerf moteur (<20m/s) alors que les patients avec une apparition tardive présente une vitesse de conduction du nerf moteur dans une gamme axonale (Reilly 2007). L'analyse du liquide céphalorachidien montre une teneur augmentée de protéines. Des changements histopathologiques caractéristiques à la neuropathie héréditaire démyélinisante sont plus importants que dans la CMT1A. Des mutations dans le gène LITAF (Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor) sur le chromosome 16p13.1-p12.3 entraîne la CMT1C. La protéine LITAF joue un rôle dans le processus de dégradation de protéine incluant la dégradation de PMP22 (Street et al., 2003). De nos jours, seulement six mutations dans le gène LITAF ont été signalées (Houlden et Relly 2006). Le début de la maladie se situe dans la deuxième décennie avec un phénotype clinique et électrophysiologique de CMT1C, phénotypiquement caractéristique de la CMT1 bien qu'il ait été trouvé chez un patient atteint de CMT2 avec une mutation du gène LITAF (Street et al., 2003 ; Bennett et al., 2004 ; Saifi et al., 2005). La vitesse moyenne de conduction du nerf moteur est de l'ordre de 16-25 m/s. La CMT1D compte pour moins de 1% des CMT et est associée à des mutations du gène EGR2 sur le chromosome 10q21.1-q22.1 (Warner et al., 1998). La protéine EGR2 est un facteur de transcription qui régule positivement l'expression des gènes de myéline (Topilko et al., 1994 ; Nagarajan et al., 2001) et pourrait aussi jouer un rôle dans la prolifération cellulaire (Joseph et al., 1988). Des anomalies d'EGR2 peut entraîner divers phénotypes comme la CMT1, le syndrome de Dejerrine-Sottas et la neuropathie congénitale hypomyélinisante (Timmerman et al., 1999 ; Warner et al., 1998). Une mutation d'EGR2 entraîne un phénotype de CMT1 avec un déficit des nerfs craniens associée à une diplopie et une parésie des cordes vocales (Pareyson et al., 2000). La vitesse de conduction du nerf moteur est réduite de manière modérée à sévère (9-42 m/s). La CMT1F est causée par des mutations dans les neurofilaments dans le NEFL sur le chromosome 8q21. NEFL est important pour l'organisation des neurofilaments et le transport axonal. Les patients avec une mutation de NEFL présentent une apparition précoce de la maladie et sont généralement atteints de manière sévère avec des vitesses de conduction du nerf ralenti de façon variable (15-38m/s). Sur la base des caractéristiques cliniques, certains d'entre eux sont diagnostiqués patients du syndrome de Dejerrine-Sottas. Les mutations dans le gène NEFL sont aussi la cause de la CMT autosomique dominante axonale liée au chromosome 8p21 (CMT2E) (Mersiyanova et al., 2000).

c. Une forme spéciale : Neuropathie héréditaire avec hypersensibilité à la pression

La neuropathie héréditaire avec hypersensibilité à la pression est associée à une délétion dans la région du gène PMP22 sur le chromosome 17p12 (Adlkofer et al., 1997). La maladie est allélique à la CMT1A. La prévalence de la neuropathie héréditaire avec hypersensibilité à la pression est de 1/10 000 individus. La NHHP est caractérisée par des douleurs épisodiques, récurrentes, une neuropathie démyélinisante focale. L'apparition de la maladie varie entre l'enfance et l'âge adulte. Les signes moteurs prédominent et se manifestent par des épisodes de faiblesse musculaire et douloureuse. La maladie se présente souvent comme une mononeuropathie asymétrique d'apparition soudaine sans douleur par exemple au réveil (Lönnqvist et Pihko 2003). La faiblesse peut durer des jours ou des mois et est accompagnée de dysesthésies. La maladie est rarement associée à une démyélinisation du système nerveux central, une myoclonie et une dystonie paroxystique (Amato et Barohn, 1996 ; Shaibani et al., 1997). Les patients de NHHP présentent des difficultés asymétriques à marcher ou une hypertrophie des mollets. L'examen neurophysiologique montre une vitesse normale de conduction du nerf ou une réduction légère, généralement plus important au niveau du nerf median avec bloc de conduction. Une forme spéciale est une mutation dans le gène de la connexin-31 (GJB3) sur le chromosome 1p35.1 est associée à la neuropathie autosomique, dominante et démyélinisante avec une déficience auditive. La connexin-32 code pour la protéine membranaire de la jonction gap, exprimée dans les canaux ioniques des nerfs périphériques et auditifs. Le phénotype clinique est d'une gravité variable comprenant des patients asymptomatiques et des patients avec des ulcères de peau et une ostéomyélite nécessitant une amputation. La vitesse de conduction du nerf moteur et sensitif sont légèrement diminuées et les amplitudes d'action du nerf sensitif et moteur légèrement réduits (Lopez-Bigas et al., 2001).

d. La neuropathie héréditaire motrice et sensitive ou CMT2 : Dominante, axonale

La CMT2 est une neuropathie axonale autosomique dominante. Elle est moins fréquente que la CMT1 avec une prévalence de 1-40 pour 100 000 individus et compte pour environ 20% de tous les patients de CMT. La CMT2A est la forme la plus répandue de la CMT2, comprenant jusqu'à 20% des CMT2 (Züchner et al., 2005 ; Verhoeven et al., 2006). La CMT2 est associée à la mutation dans le gène de la mitofusine2 (MFN2) sur le chromosome 1p36. MFN2 est une dynamine de type GTPase situé sur la membrane externe mitochondriale. Il est impliqué dans

la fusion des mitochondries et lorsqu'il est muté, ceci peut entraîner un transport insuffisant entre les mitochondries et les axones des nerfs périphériques. Une mutation dans le gène de la KIF1B situé dans la région 1p36 du chromosome a été trouvée dans quelques familles japonaises de CMT2A (Zhao et al., 2001) et n'a toujours pas été confirmée dans une autre famille de CMT2A. KIF1B sert d'intermédiaire dans le transport des vésicules synaptiques. Les patients de CMT2A présentent un phénotype classique mais plus sévère de CMT, 28% d'entre eux sont en fauteuil roulant (Verhoeven et al., 2006). La plupart des patients présentent un début précoce de la maladie (<10 ans) et sont gravement malades tandis qu'un petit groupe démarre tardivement la maladie et ont une maladie bénigne. Certains patients de CMT2A manifestent en outre une atrophie optique, aussi appelée neuropathie héréditaire sensitive et motrice VI (Züchner et Vance 2006 ; Verhoeven et al., 2006). Dans une famille australienne, la CMT2A a été associée à des caractéristiques pyramidales, précédemment décrit comme étant la neuropathie héréditaire motrice et sensitive V (NHMS V) (Zhu et al., 2005). Par ailleurs, une perte auditive sensorielle (Lawson et al., 2005) et des anomalies de la substance blanche cérébrale (Chung et al., 2006) ont été décrites chez des patients de CMT2A. Les données électrophysiologiques montrent chez la majorité des patients une vitesse de conduction nerveuse normale ou légèrement ralentie.

La CMT2B est causée par des mutations dans le gène *RAB7* (RAS-associated GTP-binding protein gene) sur le chromosome 3q13-q22 (Kwon et al., 1995 ; Verhoeven et al., 2003a). *RAB7* est impliqué dans la régulation du transport membranaire intracellulaire et est impliqué dans l'endocytose (Feng et al., 1995). CMT2B est caractérisé par une faiblesse musculaire distale et un amaigrissement mais aussi une perte sensitive entraînant une hyperkératose et des ulcérations graves des pieds qui peuvent entraîner une amputation des extrémités inférieures distales.

La CMT2C est liée au chromosome 12q23-q24 mais le gène reste à identifier. Elle est associée à une faiblesse des muscles proximaux, du diaphragme et des muscles intercostaux, une paralysie des cordes vocales et présente occasionnellement une issue fatale (Dyck et al., 1994). L'analyse électrophysiologique montre une vitesse normale de conduction du nerf moteur (>50 m/s). La CMT2D est causée par une mutation dans le gène *GARS* (glycyl-tRNA synthetase sur le chromosome 7p15 (Sivacumar et al., 2005). *GARS* est un gène de ménage et joue un rôle important dans le processus de traduction. Des mutations dans le gène *GARS* pourraient affecter la synthèse de protéines importantes pour la maintenance et l'intégrité des neurones moteurs (Antonellis et al., 2003). La maladie apparaît à un âge compris entre 8 et 36 ans et affecte principalement les muscles de la main. La vitesse de conduction du nerf moteur est normale.

La CMT2E est associée à une mutation faux sens ou à une délétion de 3 paires de base (sans décalage de cadre) dans le neurofilament de la chaîne légère sur le chromosome 8p21 (De Jonghe et al., 2001). Il en résulte une destruction de l'organisation des neurofilaments et du transport axonal. La fréquence de la CMT2E au sein des patients de CMT est de 1,9% (Jordanova et al., 2003). La maladie débute par des difficultés à la marche généralement avant l'âge de 13 ans. La parésie dans la partie distale des membres inférieurs varie d'une faiblesse légère à une paralysie complète. La moyenne de la vitesse de conduction du nerf moteur est réduite de façon modérée à sévère et sont dans l'ordre de 13 à 38 m/s et le potentiel d'action du nerf moteur est très réduit (Jordanova et al., 2003). Des mutations dans NEFL suggèrent que ces maladies sont alléliques. La CMT2F est causée par une anomalie génétique sur le locus 7q11-q21. Le gène causal code pour HSPB1 (heat shock protein B1) aussi appelé HSP27 (Evgrafov et al., 2004 ; Ismailov et al., 2001). Les protéines « heat shock » ou de stress sont synthétisées comme une réponse cellulaire à divers facteurs incluant la lésion cellulaire. Ces protéines ont des fonctions importantes incluant la protection de structures d'autres protéines. (Gamulin et al., 2006). De nos jours, seulement deux familles ont été signalées atteintes de CMT2F. CMT2F débute généralement entre 15 et 25 ans avec une évolution lente et progressive. Les muscles ont une faiblesse symétrique au niveau des membres inférieurs entraînant une « fonte » des pieds, des déformations du pied et des déficiences sensitives d'intensité légère à modérée. Plusieurs années plus tard, une atrophie distale des muscles des membres supérieurs provoquant des mains en « griffe ». Les analyses électrophysiologiques montrent des amplitudes d'action du nerf moteur absentes ou nettement réduites.

e. CMT intermédiaire : dominant, intermédiaire

Plusieurs loci et gènes ont été décrits pour être à l'origine de la CMT de type dominant et intermédiaire (DI-CMT) : 10q24.1-q25.1 (gène non identifié, Verhoeven et al., 2001, DI-CMTA), 19p12-13.2 (dynamin2 ou DNM2, Züchner et al., 2005 ; DI-CMTB) 1p34-p35 (tyrosyl-tRNA synthétase ou YARS; Jordanova et al., 2006; DI-CMTC), 1q22 (MPZ; Mastaglia et al., 1999; DI-CMTD). DNM2 et RAB7 sont impliqués dans le transport vésiculaire et l'endocytose (McNiven 1998). YARS joue un rôle essentiel dans la synthèse protéique dans toutes les formes de vie ainsi que la transmission du signal du nerf au muscle (Jordanova et al., 2006). Les caractéristiques cliniques sont d'une sévérité variable. La neutropénie a lieu chez certains patients avec des mutations de DNM2. Le CMT intermédiaire de type dominant se manifeste avec des caractéristiques électrophysiologiques et pathologiques aussi dans le CMT1 et CMT2. La vitesse de conduction du nerf médian est de l'ordre de 25 à 45 m/s.

f. CMTX1 : lié à X, dominant et démyélinisant

CMTX1 est la deuxième forme la plus courante de CMT avec une fréquence de 7 à 11% de tous les patients de CMT (Boerkel et al., 2002). La CMTX1 est une CMT dominant liée à X avec une caractéristique axonale et démyélinisante causée par des mutations dans GJB1 sur le chromosome Xq13.1 (Janssen et al., 1997). Plus de 240 mutations dans GJB1 ont été rapportées. Le produit du gène Sox10 se lie directement au promoteur de GJB1 et active son expression dans les cellules de Schwann myélinisantes. Des mutations dans le gène Sox10 sur le chromosome 22q13 sont associées au syndrome distinct de Waardenburg-Shah incluant la neuropathie démyélinisante, la leucodystrophie démyélinisante, le syndrome de Waardenburg et la maladie de Hirschprung (Inoue et al., 2004). GJB1 code pour la protéine de la connexine 32 (Cx32). La Connexine 32 est une protéine de gap jonction localisée au niveau des nœuds de Ranvier et est impliqué dans le transfert de matériel de faible poids moléculaire entre les cellules (Bergoffen et al., 1993). En raison de la transmission héréditaire, les hommes sont plus touchés que les femmes. Les hommes affectés présentent des symptômes modérés à sévères, tandis que les femmes sont soit légèrement atteintes ou asymptomatiques (Hahn et al., 1990). Les symptômes se développent en fin de jeunesse, habituellement après l'âge de 15 ans chez les hommes et plus tard chez les femmes atteintes. Les caractéristiques cliniques incluent l'implication des muscles des mains avec une atrophie particulièrement prononcée au niveau des muscles du thénar. La faiblesse des muscles distaux et l'atrophie impliquent aussi les membres inférieurs et est associé à des pieds creux. La surdité, l'implication du système nerveux central, les anomalies de la vision et de l'audition peuvent se développer plus tard chez les patients de CMTX1. La connexine 32 est exprimée par les cellules de Schwann myélinisantes dans le nerf VIII. Les patients atteints de CMT1X présentent généralement un ralentissement de la vitesse de conduction nerveuse. La vitesse de conduction du nerf moteur median est de l'ordre de 30-40 m/s chez les hommes atteints et de 30-50 m/s chez les femmes (Kleopa et Scherer, 2006). La vitesse de conduction du nerf moteur chez les hommes gravement atteints est de l'ordre de 10-37 m/s. Au niveau des CMT1X, il est aussi observé une perte axonale associée à des blocs de conduction et une dispersion évoquant les polyneuropathies démyélinisantes chroniques acquises. Chez certains patients de CMTX1, il y a une participation transitoire du système nerveux central comme c'est le cas des anomalies de la substance blanche associée à une ataxie, de dysarthrie ou de confusion (Panas et al., 2001, Kawakami et al., 2002). Une encéphalopathie transitoire peut survenir suite à une infection (Schelhaas et al., 2002), un

exercice (Hanemann et al., 2003 ; Taylor et al., 2003) ou un voyage à haute altitude (Paulson et al., 2002 ; Hanemann et al., 2003). La biopsie nerveuse montre une dégénérescence axonale et des démyélinisations segmentaires avec des bulbes d'oignons.

g. CMT3 : le syndrome de Dejerrine-Sottas

Le mode de transmission du syndrome de Dejerrine-Sottas (DSS) peut être autosomique dominante, récessive ou sporadique. La CMT3 A (DSS A) est une forme autosomique dominante de « DSS », causé par des mutations ponctuelles dans le gène PMP22 du chromosome 17p11.2-12 (Roa et al., 1993). La CMT3B (DSS-B) est causée par une mutation dominante ou récessive sur MPZ du chromosome 1q22 (Hayasaka et al., 1993a). Les anomalies génétiques à l'origine de la CMT3C (DSS-C) est liée au chromosome 8q23-q24 dans une famille Iowa avec un mode de transmission dominant (Ionasescu et al., 1996). Des mutations sur le gène de la periaxine (PRX) sur le chromosome 19q13.1-13.2 est à l'origine de la CMT3D (ou CMT-4F) avec un mode de transmission récessif (Boerke et al., 2001b). La DSS-EG est associée à une mutation dominante ou de *novo* dans le gène EGR2 sur le chromosome 10q21-22 (Boerke et al., 2001a). Des mutations de NEFL peuvent aussi entraîner des phénotypes de DSS.

Le syndrome de Dejerrine-Sottas (DSS, la CMT3A) est une forme sévère de polyneuropathies démyélinisantes avec un début précoce (avant l'âge de 3 ans), et des vitesses de conduction nerveuse très ralenties (<10 m/s).

h. Classification des différents types de CMT et mutations impliquées

Type de CMT	Physiologie	Transmission	Locus	Gène	Divers
CMT1A	Démyélinisation	Autosomique dominante	17p11.2	<i>PMP22</i>	type le plus commun de CMT
CMT1B	Démyélinisation	Autosomique dominante	1q22	<i>MPZ (P0)</i>	
CMT1C	Démyélinisation	Autosomique dominante	16p13.3-p12	<i>LITAF</i>	
CMT1D	Démyélinisation	Autosomique dominante	10q21.1-q22.1	<i>EGR2</i>	
CMT1E	Démyélinisation	Autosomique dominante	17p11.2	<i>PMP22</i>	surdit�
CMT1F	Démy�linisation	Autosomique dominante	8p21	<i>NEFL</i>	
CMT2A1	Axonale	Autosomique dominante	1p36.2	<i>KIF1B</i>	
CMT2A2	Axonale	Autosomique dominante	1p36.2	<i>MFN2</i>	
CMT2B	Axonale	Autosomique dominante	3q21	<i>RAB7</i>	ulcères communs de pied
CMT2B1	Axonale	Autosomique récessive	1q21.2	<i>LMNA</i>	
CMT2B2	Axonale	Autosomique récessive	19q13.3	Non Connu	
CMT2C	Axonale	Autosomique dominante	12q23-q24	Non Connu	atteinte de diaphragme et de cordes vocales
CMT2D	Axonale	Autosomique dominante	7p15	<i>GARS</i>	les mains sont affectées plus que des pieds
CMT2E	Axonale	Autosomique dominante	8p21	<i>NEFL</i>	
CMT2F	Axonale	Autosomique dominante	7q11-q21	<i>HSPB1</i>	
CMT2G	Axonale	Autosomique dominante	12q12-q13.3	Non Connu	
CMT2H	Axonale	Autosomique récessive	8q13-21.1	<i>GDAP1</i>	signes pyramidaux
CMT2I	Axonale	Autosomique dominante	1q22	<i>MPZ (P0)</i>	
CMT2J	Axonale	Autosomique dominante	1q22	<i>MPZ (P0)</i>	perte d'audition et anomalies de pupille
CMT2K	Axonale	Autosomique r�cessive ou dominante	8q13-q21.1	<i>GDAP1</i>	
CMT2L	Axonale	Autosomique dominante	12q24	<i>HSPB8</i>	
CMT3A	D�my�linisation	Autosomique dominante	17p11.2	<i>PMP22</i>	maladie de D�jerine-Sottas (hypomy�linisation cong�nitale s�v�re)
CMT3B	D�my�linisation	Autosomique dominante	1q22	<i>MPZ (P0)</i>	
CMT3C	D�my�linisation	Autosomique dominante	10q21.1-q22.1	<i>EGR2</i>	
CMT4A	D�my�linisation	Autosomique récessive	8q13-21.1	<i>GDAP1</i>	
CMT4B1	Démyélinisation	Autosomique récessive	11q22	<i>MTMR2</i>	
CMT4B2	Démyélinisation	Autosomique récessive	11p15	<i>MTMR13</i>	
CMT4C	Démyélinisation	Autosomique récessive	5q32	<i>SH3TC2</i>	
CMT4D	Démyélinisation	Autosomique récessive	8q24.3	<i>NDRG1</i>	
CMT4E	Démyélinisation	Autosomique récessive	1q22-10q21.1-q22.1	<i>MPZ (P0)</i> ou <i>EGR2</i>	
CMT4F	Démyélinisation	Autosomique récessive	19q13	<i>PRX</i>	
CMT4G	Démyélinisation	Autosomique récessive	10q23.2	Non Connu	
CMT4H	Démyélinisation	Autosomique récessive	12p11.2	<i>FGD4</i>	
CMTX	Axonale ou Démyélinisation	Li�e à l'X	Xq13.1	<i>GJB1</i>	

Tableau 1 : Classification et mutations impliquées

PMP22 : Peripheral Myelin Protein 22, MPZ : Myelin Protein Zero, LITAF : Lipopolysaccharide-induced Tumor Necrosis  , EGR2 : Early Growth Response2, NEFL : Neurofilament Light Chain, KIF1B : Kinesin Motor Protein 1B, MFN2 : Mitofusin 2, RAB7 : Small Guanosine Triphosphatase Late Endosomal Protein RAB7, LMNA : lamine A/C gene, GARS Glycyl-Transfer RNA Synthetase, HSPB1 : Heat-Shock Protein beta-1, GDAP1 : Ganglioside-induced Differentiation-Associated Protein 1, HSPB8 : Heat-Shock Protein beta-8, MTMR2 : Myotubularin-Related Protein 2, MTMR13 Myotubularin-Related Protein 13, SH3TC2 : SH3 domain and tetratricopeptide repeats 2, NDRG1 N-myc Downstream-Regulated Gene 1, PRX Periaxin, FGD4 : actin-filament binding protein Frabin, GJB1 : Gap-Junction Beta-1 Protein (Connexin 32).

B. Implications des protéines myéliniques dans des neuropathies héréditaires

Les doses élevées de PMP22 et de PLP entraînent toutes les deux des myélinopathies humaines et des rongeurs (respectivement la CMT1A et la maladie de Pelizeaus-Merzbacher) et 80% des surexpressions de MPZ entraînent des neuropathies chez les souris. Des trisomies partielles du chromosome 1 humain qui inclut le locus MPZ 1q22 sont rares et donnent des phénotypes complexes, un de ses cas inclut des contractures des extrémités qui seraient à l'origine des neuropathies périphériques (Chen et al., 1994). En effet, des mutations faux sens de P0 sont associées à des neuropathies humaines démyélinisantes CMT1B, le syndrome de Dejerine-Sottas et la neuropathie congénitale hypomyélinisante (CHN ; Warner et al., 1996). La réduction importante de la vitesse de conduction nerveuse (1 à 2 m/s), la rareté de la myéline active ou en bulbe d'oignon et la redondance de la formation de la membrane chez des souris surexprimant P0 ressemble à la neuropathie congénitale hypomyélinisante (Harati et Butler, 1985). De bas niveaux de surexpression de P0 produisent une hypomyélinisation transitoire chez des souris, similaire à la neuropathie congénitale hypomyélinisante (Ghamdi et al., 1997 ; Levy et al., 1997). Des mutations de Krox20 sont associées à la survenue de neuropathies congénitales hypomyélinisantes. Krox20 peut réguler l'expression de P0 (Topilko et al., 1994 ; Zorick et al., 1999) ; la surexpression de MPZ pourrait contribuer à la pathogénèse des mutations d'EGR2. Il est recommandé de la prudence dans le traitement des neuropathies CMT1B dans lesquels des mutations de MPZ predisent une perte d'expression de P0 et pour lequel le traitement par remplacement de gène pourrait ainsi être considéré (Shy et al., 1995 ; Guenard et al., 1999). Une telle thérapie peut exiger une régulation précise de P0 dans le nerf humain, seulement 60% des surexpressions chez des souris entraînent une déficience de la formation de la myéline. Enfin les animaux Tg80.2 développent une atrophie et des changements morphologiques dans les muscles squelettiques et une tendance à la réduction de l'amplitude du potentiel d'action nerveux, l'ensemble suggère une pathologie axonale. Des défauts primaires dans les cellules de Schwann de modèles de souris montrent qu'ils peuvent entraîner des changements secondaires au niveau des propriétés axonales (de Waegh et al., 1992 ; Yin et al., 1998) incluant des nerfs distaux où les axones pourraient dégénérer (Frei et al., 1999 ; Sancho et al., 1999). De façon similaire, des neuropathies démyélinisantes héréditaires chez l'homme se manifestent par des atteintes importantes de l'axone, de prédominance distale entraînant une invalidité significative. Ainsi, les souris surexprimant P0 peuvent provenir de l'utilisation d'autre modèle pour l'étude de la pathogénèse de la destruction axonale comme une conséquence d'un dysfonctionnement des cellules de Schwann primaires.

C. Thérapie des myelinopathies périphériques humaines sur la base de la transcription

La plupart des myelinopathies périphériques héréditaires sont causées par une altération du niveau des gènes de la myéline, par exemple PMP22 et P0 (Saifi et al., 2003; Szigeti et al., 2006; Wrabetz et al., 2006). Par conséquent, la thérapie basée sur la transcription à effet relativement subtile changeant l'expression du niveau pourrait être une méthode fructueuse pour le traitement de ces maladies communes. Un des points actifs de l'investigation est que les récepteurs des stéroïdes comme les récepteurs de la progestérone et des glycocorticoïdes jouent un rôle important dans la régulation de la myélinisation. Les résultats des études récentes utilisant les antagonistes de la progestérone pour réduire l'expression de PMP22 sur des modèles de rat de CMT1A a montré des effets bénéfiques (Sereda et al., 2003). Bien qu'il ait montré que la progestérone améliore la myélinisation et élève l'expression de PMP22 et d'autres gènes de la myéline (Koenig et al., 1995 ; Melcangi et al., 1999), le site spécifique de liaison du récepteur de la progestérone n'a pas été défini dans les gènes de la myéline. Des études récentes indiquent que l'effet de la progestérone peut être médié par une synthèse de protéine myélinique stimulée par Krox20/ Egr2 et Sox10 dans les cellules de Schwann (Guennoun et al., 2001 ; Magnaghi et al., 2007), ce qui serait conforme à la régulation négative des niveaux de MPZ dans le nerf sciatique de rat (Melcangi et al., 2003) après administration d'antagonistes de glycocorticoïde/progestérone.

II. PROBLEMATIQUE DE LA THESE

Un des principales études du laboratoire est l'identification de facteurs de maintenance de la gaine de myéline périphérique, des mutations de certaines étant impliquées dans l'apparition de neuropathies périphériques. Cette thèse vise particulièrement le gène EGR2, dont les mutations sont à l'origine d'hypomyélinisation et de demyélinisation à l'origine de maladies de nerfs périphériques telles que la maladie de Charcot Marie Tooth. Elle s'est aussi intéressé à Sox10 qui active l'expression de Krox20, à la LPC qui est un agent démyélinisant entraînant les cellules de schwann à l'état immature où ils expriment Sox2. Elle a fait aussi cas de C-jun qui est un régulateur négatif de la myélinisation, à POU6F1 qui est un régulateur positif de la

myélinisation, à Dicer qui joue un rôle dans la maturation des micro-ARN. Des atteintes à chacun de ces facteurs sont à l'origine d'un défaut de myélinisation. Les cellules de Schwann se différenciant en cellules myélinisantes chez l'embryon de rat à l'âge compris entre E15 et E17 et commençant à former la gaine de myéline à la naissance, nous avons fait des co-cultures de cellules de Schwann et de neurones provenant de ganglions d'embryons (E15-E17) de rat. Du fait que la CMT1A est caractérisée par une dégradation de la gaine de myéline à l'âge adulte, nous avons émis l'hypothèse qu'une maintenance de cette gaine est indispensable après sa formation pour prévenir la population de la CMT. C'est dans cette optique que nous avons fait les co-cultures puis avons cherché à comprendre la physiopathologie de cette maladie. Après l'induction de la formation de la gaine de myéline à l'acide ascorbique, nous avons utilisé des siRNA pour bloquer la transcription des gènes cibles et avons marqué en immunofluorescence la protéine MBP (Myelin Associated Glycoprotein) puis quantifier l'ARNm de ces gènes après le traitement avec les siRNA.

Par ailleurs, des injections de siRNA et de LPC dans le nerf sciatique de rat adulte ont été réalisées. Les injections de siRNA ont ciblé en particulier EGR2, POU6F1, GDAP1 et Dicer. L'effet sur la myélinisation a été observé en microscopie optique, électronique et au microscope à fluorescence après immunomarquage des protéines myélinique notamment P0 mais aussi des macrophages. Les temps entre l'injection et le prélèvement ont été de 1 jour, 3 jours, 5 jours et une semaine. La durée de transfection sur les cultures cellulaires a été de 3 jours, 5 jours et une semaine. Les nerfs ayant reçu l'injection de LPC (10 mg/ml) ont été prélevés 5 jours plus tard et son incubation dans les cultures cellulaires a duré 15 heures puis un immunomarquage fut réalisé. Ces techniques d'injection de siRNA dans le nerf sciatique et de transfection dans les cocultures ont fourni une preuve de concept de l'utilisation de ces siRNA pour l'inactivation de gène. Pour ce qui concerne le gène EGR2, la perte de P0 après immunomarquage sur des nerfs ayant reçu une injection aux siRNA anti EGR2 montrent que ce gène intervient dans la maintenance myélinique comme l'avait déjà montré Laurence et al., 2006, des expériences en microscopie électronique viennent renforcer ces résultats. Ceux-ci sont confirmés par l'immunomarquage de la protéine MBP sur les cocultures après une transfection aux siRNA anti EGR2. La quantification des ARNm après transfection aux siRNA anti EGR2 et anti dicer ont montré respectivement une réduction de 50-60% et de 60-70% de leur expression.

RESULTATS ET DISCUSSION

Article 1 (en révision)

Self-delivery siRNAs as a versatile tool to study molecular effectors of myelin maintenance in vivo

Adama Ouedraogo ^a, Laurence Richard ^{a,b}, Prisca Lebeau ^b, Franck Sturtz ^{a,c}, Jean-Michel Vallat ^{a,b}, Benoît Funalot ^{a,b,c}

^a EA6309, School of Medicine, University of Limoges ; ^b National Referral Center for Rare Peripheral Neuropathies and Department of Neurology, ^c Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University Hospital, Limoges, France.

Abstract

The synthesis of the myelin sheath by Schwann cells in the peripheral nervous system is under the control of several transcription factors including Egr2, which was shown to be also involved in the maintenance of peripheral myelin. We set up a new method to study the involvement of various genes in peripheral myelin maintenance, using small interfering RNAs (siRNAs) to silence target genes *in vitro* and *in vivo*. We used modified self-delivery siRNAs to silence candidate genes without using transfection reagents. These siRNAs were first used on organotypic co-cultures of dorsal root ganglia from embryonic rat and then injected into the sciatic nerves of adult rats. We showed that control non-targeting siRNAs did not induce significant demyelination either in co-cultures or *in vivo*, after direct injection in sciatic nerves. We then showed that anti-Egr2 siRNAs down-regulated *in vitro* their target gene expression by ~60%. In addition, treatment with anti-Egr2 siRNAs resulted in abnormalities of the myelin sheaths in co-cultures. The injection of anti-Egr2 siRNAs in the sciatic nerves of adult rats induced a significant and rapid demyelination, as shown by the loss of Myelin Protein Zero expression in the injected area on immunohistochemistry experiments (optic microscopy) and by direct evidence of demyelination on epon-embedded transversal sections of sciatic nerves (optic and electron microscopy). These results confirm previous data involving Egr2 in active myelin maintenance, which were obtained using conditional knockout experiments in mice. Injections of anti-Dicer siRNAs similarly induced sciatic nerve demyelination, establishing that Dicer expression in adult peripheral nerves is necessary for proper myelin maintenance. Our results constitute a proof of concept for the use of self-delivery siRNAs to investigate the molecular mechanisms of myelin maintenance *in vivo* and also to induce a gene-driven demyelination “on demand” in peripheral nerves.

Introduction

The coexistence of neurons and glial cells is a characteristic feature of all higher vertebrate nervous system. In peripheral nerves, Schwann cells produce segments of myelin, a multilamellar lipid-rich membrane that is wrapped around axons. The main function of myelin is to serve as an insulator to facilitate signal propagation along axons. The Egr2/Krox20 transcription factor is a prime regulator of Schwann cells myelination, nerves from Egr2-knockout mice being hypomyelinated and populated with Schwann cells that fail to exit the cell cycle [1]. Mutations in EGR2 are found in patients with congenital hypomyelinating neuropathy, Charcot-Marie-Tooth disease or Dejerine-Sottas syndrome [2, 3]. During the last two decades, many molecular effectors of peripheral nerve myelination have been identified [4]. The permanent expression of Egr2 in myelinating Schwann cells and its down-regulation after axonal injury that results in the elimination of the myelin sheath, in a process known as Wallerian degeneration [5], raised the possibility that Egr2 expression might be required for myelin maintenance. Specific inactivation of Egr2 in adult mouse sciatic nerve by inducible knockout experiments resulted in severe demyelination, involving rapid Schwann cells dedifferentiation and increased proliferation, followed by an attempt to remyelinate and a block at the promyelinating stage. These data established that Egr2 is not only required for the onset of myelination but that it is also crucial for the maintenance of the myelinating state [6]. Apart from this study using conditional knockout mice, very little knowledge is available on the maintenance of peripheral myelin [7-9].

We set up a new method to study the involvement of genes in peripheral myelin maintenance using small interfering RNAs (siRNAs) to silence target genes *in vitro* and *in vivo*. For this purpose, we used “self-delivery” siRNAs (Accell siRNA, Dharmacon) to silence candidate genes without using transfection reagents. These modified siRNAs were previously shown to

be able to down-regulate target genes *in vivo* after direct injection in skin [10-12]. Another siRNA targeting KLF6-SV1 was shown to inhibit ovarian cancer development after intra-peritoneal injection [13]. In our study, anti-Egr2 and anti-Dicer siRNAs were used on co-cultures of myelinating Schwann cells and neurons from E17 embryonic rat dorsal root ganglia (in vitro model) and in sciatic nerves of adult rats (direct injection of siRNAs, *in vivo* model). This allowed us to confirm the involvement of EGR2 in peripheral myelin maintenance *in vivo*, and to show that the miRNA-processing protein Dicer (which was recently shown to be involved in peripheral nerve myelination [14-18]) is also involved in myelin maintenance in adult rat sciatic nerves.

Materials and methods

Animals

For cocultures of dorsal root ganglia (neurons and Schwann cells), we used E15-E17 embryos from adult pregnant female Sprague-Dawley rats. For *in vivo* study of myelin maintenance and injection of siRNAs, we used adult male Sprague-Dawley rats between 10 and 12 weeks of age. All rats were obtained from DEPRE breeding center, Saint-Doulchard, France.

Animals were housed two animals per cage, in a temperature and humidity controlled room with 12:12 h light/dark cycle. The animals were fed with standard chow and water *ad libitum*. Adequate measures were taken to minimize pain and discomfort. Animals were housed for at least one week before entering the experiments. All procedures were performed with the approval of the animal ethics committee of the University of Limoges (authorization number 15-2013-15).

Organotypic DRG culture

Dissection of dorsal root ganglia

The procedure used for dissection is a modification of the method described by Svenningsen et al. for the preparation of neuron-Schwann cell co-cultures [19]. A pregnant, E15 to E17 female Sprague-Dawley rat was anesthetized by inhalation of isoflurane mixed to O₂, produced by an anesthesia system adapted to rats. The uterus with embryos was extracted under sterile conditions and placed in 100 mm Petri dish with cold sterile L15 medium. The embryos were removed and transferred into a new dish containing cold L15 medium. The rat was sacrificed by intracardiac injection of ketamine 0.5 ml at 10 mg/ml (PANPHARMA). In each embryo, the spinal cord was removed under a dissection microscope (Leica MZ 6) and the DRG were cut one by one using microscissors and transferred to an eppendorf tube containing 1 ml cold L15 medium.

Dissociation and plating

The dissociation of embryonic DRG was performed as previously described [14]. The cells were pelleted and resuspended in Neurobasal medium (Gibco) containing 2% of B27 (Gibco), 0.3% of glutamax (Gibco), 100 ng/ml of nerve growth factor (Beckton-Dickinson) and 1% of penicillin-streptomycin (Invitrogen). This medium was prepared in advance and frozen in aliquots to feed the cultures. The cells were plated on Matrigel (1:3) coated 12-well plates (Thermo Fischer Scientific Nunc A/S) at $1-5 \cdot 10^4$ cells/ ml and incubated at 37°C with 5% CO₂ and 90% humidity. Seven days after plating, 50 µg/ml of ascorbic acid (Sigma) was added to the medium to trigger myelination by the endogenous Schwann cells. Medium was changed every two days.

Treatment of organotypic cultures with self-delivery siRNAs

We used pools of modified self-delivery Accell siRNAs (Thermo scientific Dharmacon) diluted at 1 μ M in culture medium. No ascorbic acid was added to the culture medium during the siRNA treatment in order to avoid stimulating myelination during the experiment. Each pool of Accell siRNAs contains 4 different short sequences targeting the same mRNA (Table 1). Non-targeting Accell siRNAs were used as control. The co-cultures were treated at 1 μ M for each pool of siRNAs (following the manufacturer instructions) for three days, five days and one week. The medium was changed on day 3 (with new siRNAs added) in the case of a five-day treatment and also on day 5 in the case of a one-week treatment.

Relative quantification of mRNA by RT-qPCR in co-cultures

For real-time PCR, total RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen). Extraction was carried out according to the protocol recommended by the kit supplier. The concentration and purity of total RNA were measured using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech). The reverse transcription was performed using Quantitect reverse transcription kit (Qiagen) according to the supplier protocol. The quantification was carried out in a Rotor-Gene 6000 apparatus (Corbett Life Science, series software 1.7) in a final volume of 25 μ l, with 12.5 μ l of 2x Rotor-Gene SYBR Green PCR master mix (Qiagen), 1 μ M of forward primer and reverse primer, 2 μ l of template cDNA (\leq 100 ng/reaction), completed with RNease-free water. Quantification was performed according to the supplier recommendations. Gapdh (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) and Hprt (Hypoxanthine Phosphoribosyl Transferase) were used as reference genes. The primers used for RT-qPCR are mentioned in table 2.

Immunostaining of co-cultures

The co-cultures were fixed with 4% paraformaldéhyde in phosphate-buffer saline (PBS) for 15 min at room temperature. They were rinsed with PBS 3x5 min and permeabilized with 0.5% triton x-100 in PBS for 5 min. The saturation was carried out with 3% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min. A mouse monoclonal anti-myelin basic protein (MBP) antibody (clone SMI-94, Covance) diluted at 1:1000 in 1.5% BSA was added and incubated overnight at 4°C. Cells were rinsed with PBS 3x5 min and a secondary goat anti-mouse antibody conjugated to Alexa 488 (Invitrogen) diluted 1:500 was added for 2 hours at room temperature and rinsed 3x5 min. Cultures were treated with Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, France) diluted at 1:5000 in PBS for 5 min; finally rinsed 3x5 min with PBS and then examined under an inverted fluorescence microscope (Leica DM IRB).

In vivo injection of siRNA in the rat sciatic nerve

Rats were deeply anesthetized by inhalation of isoflurane mixed to O₂. All surgical techniques were done under aseptic conditions and performed using a standard dissecting microscope. After anesthesia, the hind legs were attached; the sciatic nerve was exposed unilaterally after skin and muscle incision. The injection point was located above the bifurcation of the nerve in the mono fascicular part of the sciatic nerve. Injections were performed under a dissection microscope, using a manually-controlled micro-syringe (supplementary figure 1). The needle was inserted across the perineurium and then the selected volume of siRNA diluted in isotonic NaCl was slowly injected into the nerve (in the endoneurium). After injection, a mark was made with a non-resorbable suture fixed at the level of the injection point, on the lateral muscle. The muscle and skin were closed with staples. The rats were returned to their cages and regained mobility. At various times after injection, the rats were again anesthetized in order to remove the sciatic nerve and then sacrificed by intra-cardiac injection of ketamine

(0.5 ml at 10 mg/ml; PANPHARMA). A rather large fragment of the sciatic nerve (approximately 1 cm-long) was removed in order to have both parts of the nerve above and below the injection point. For each time and each siRNA pool (non-targeting siRNAs and anti-Egr2 siRNAs), we obtained three formalin-fixed paraffin-embedded sciatic nerves and three glutaraldehyde-fixed epon-embedded nerves.

Fixation and inclusion of sciatic nerves

For the immunohistochemical study of the nerve, nerve fragments were fixed in formalin and included in paraffin. Five micrometer-thick sections were performed using a Leica microtome. Dewaxing was done through two baths in toluene and two others in absolute alcohol. The rehydration was performed using a water bath for 10 min.

For semi-thin and ultrastructural analysis of sciatic nerves, samples were fixed in 2.5% glutaraldéhyde diluted in cacodylate buffer, postfixed in 1% osmic acid, dehydrated in successive acetone baths and included in epoxy resin. Dehydration was obtained by increasing concentrations of acetone diluted in H₂O and inclusion was carried out in epoxy resin. Semi-thin transverse sections were performed using an ultramicrotome, mounted on glass slides and stained with toluidine blue. An ultrastructural study was performed on ultra-thin sections (60-100 nm), after staining with acetate uranyl and lead citrate, using an electron microscope (JEOL 1011).

Immunohistochemistry of sciatic nerves

Unmasking of antigenic sites on rehydrated sections was performed at 98°C for 25 min in retrieval solution (Dako). The slides were then rinsed with water. 100 µl of peroxidase blocking solution was placed on the slide for 5 min and then rinsed with water and PBS. 100 µl of goat serum was placed on each slide for 30 min and then 100 µl of primary antibodies.

The slides were incubated overnight at 4°C and then rinsed in PBS. The revelation was made using 100 µl of biotinylated secondary antibodies (vectastain diluted biotinylated antibody, VECTOR) for 30 min. The slides were again rinsed with PBS. Vectastain elite ABC kit was added to each slide for 30 min and then 100 µl of 3, 3'-diaminobenzidine was added. H₂O₂ was added, the slides were rinsed with water and placed for 15 s in hematoxylin, rinsed again in water, then in ammonia water and finally in water. Two baths of absolute alcohol and two others of toluene were realized and the cuts were mounted between slide and coverslip in a non-aqueous mounting medium.

Statistical analysis

The relative mRNA expression was calculated using the conventional delta-delta Ct method [20]. Student t-test was used to analyze the results. GraphPad Prism was used to present the results as graphs with standard error bars. Each value was expressed as mean ± s.e.m (standard error of the mean). Values of $p < 0.05$ were considered as statistically significant.

Results

Effect of self-delivery siRNAs on Egr2 expression *in vitro*

In order to determine whether self-delivery siRNAs were able to down-regulate Egr2 mRNA in co-cultures of DRG neurons and Schwann cells, cultured cells were incubated with Accell siRNAs diluted at 1 µM in culture medium. Control cultures receiving no siRNAs, non-targeting siRNAs and cultures receiving anti-Egr2 siRNAs were treated simultaneously. Quantification of Egr2 expression after treatment with anti-Egr2 siRNAs showed a significant decrease (63%) of Egr2 expression relative to GAPDH. By contrast, treatment with non-targeting siRNAs did not induce significant changes in Egr2 mRNA expression (Figure 1).

Using Hprt, another stable reference gene, as an internal control resulted in very similar results (data not shown).

Effect of siRNAs targeting Egr2 on myelin maintenance *in vitro*

To detect the effect of anti-Egr2 siRNAs on myelin maintenance *in vitro*, we performed MBP immunostaining on co-cultures at various times after siRNA treatment (3 days, 5 days and one week). Co-cultures treated with anti-Egr2 siRNAs showed moderate signs of demyelination at day 3, manifesting as an irregular and weaker MBP immunostaining in myelinated fibers (Fig. 2). Treatment of co-cultures during 5 or 7 days with anti-Egr2 siRNAs did not result in more marked areas of demyelination (data not shown). In particular, anti-Egr2 siRNA did not induce a diffuse and massive demyelination, as can be observed with some chemical demyelinating agents such as lysophosphatidylcholine. Treatment with non-targeting siRNAs (Fig. 2C-D) did not result in any significant demyelination.

Effect of siRNAs targeting Egr2 on myelin maintenance *in vivo*

Sciatic nerves were injected with anti-Egr2 and non-targeting siRNA using 30μl at 1μM of each pool. We studied the temporal pattern of demyelination by examining serial longitudinal sections of sciatic nerves removed at various times (1 day, 3 days, 5 days, one week) after injection. In the immunohistochemistry experiments, acute demyelination manifested as a loss of Myelin Protein Zero (P₀) staining, associated with invasion by macrophages (CD68-positives cells). There was no visible loss of P₀ staining and no invasion by macrophages in nerves treated by non-targeting siRNAs at any time point. In the sciatic nerve that had received anti-Egr2 siRNAs, a focal demyelination (corresponding to the injected area) was observed on samples taken 3 days, 5 days and one week after injection (fig 3). No demyelination was observed in nerves taken 1 day after injection. P₀-negative areas were

smaller in nerves taken 3 days after injection and larger in the nerves taken at 5 days and one week (Fig. 3B-D). In addition, anti-CD68 immunostaining showed an absence of CD68 staining at 1 day and presence of an increasing number of macrophages at 3 days, 5 days and one week (Fig. 3E-G).

On semi-thin (light microscopy) and ultra-thin (electron microscopy) transverse sections, marked acute demyelination was visible for the samples taken 5 days and one week after injection of anti-Egr2 siRNA. The semi-thin sections showed demyelination in nerves treated with siRNAs targeting Egr2 but no or very slight demyelination in nerves treated with non-targeting siRNAs (Fig 4A-C). Ultrastructural analysis showed a marked acute and focal demyelination after treatment with anti-Egr2 siRNAs, which was absent from the nerves treated with control siRNAs (Figure 5A-B).

Effect of siRNAs targeting Dicer on gene expression and myelin maintenance

Treatment of co-cultures with anti-Dicer siRNAs was associated with a 72% reduction of Dicer mRNA relative to control (Figure 6A). Injection of anti-Dicer siRNAs in rat sciatic nerves resulted in active demyelination, as shown by semi-thin (Fig. 6B) and ultra-thin (Fig. 6C-D) sections, 5 days after treatment. Patterns of demyelination were not significantly different from those observed with anti-Egr2 siRNAs. These last results demonstrate that expression of Dicer is necessary for peripheral myelin maintenance in adult rat sciatic nerves.

Discussion

Egr2/Krox20 is a key regulator of the peripheral nervous system myelination. It is activated in Schwann cells after axonal contact, before myelination [21, 22] and then drives peripheral nerve myelination. In the peripheral nerve, Egr2 is expressed in myelinating Schwann cells

but remains expressed at high levels throughout life, which led to the hypothesis that Egr2 could also be involved in peripheral myelin maintenance. In experiments using inducible knockout of the Egr2 gene in mouse sciatic nerves (Cre-Lox excision of the Egr2 gene using estrogen receptor-induced Cre expression), Decker et al. showed that focal excision of the Egr2 gene after injection of hydroxytamoxifen resulted in active demyelination in the injected area [6]. This suggested that Egr2 constant expression in the peripheral nervous system is required for peripheral myelin maintenance. In the absence of Egr2 gene expression, a specific program of dedifferentiation would be engaged, leading to active myelin destruction. One possible mechanism for this active demyelination would be the reactivation of Egr2-silenced genes involved in maintaining the immature stage of Schwann cells [6].

We took advantage of self-delivery siRNAs to perform an *in situ* silencing of Egr2 mRNA in rat sciatic nerve without affecting the Egr2 gene itself. This approach combines several advantages: it avoids the need for a transgenic rodent model, which generation is expensive and time-consuming; it also allows to deliver siRNAs without any transfection reagent, which could be toxic for the nerve cells, induce reactive demyelination by itself, and could also be relatively inefficient for the transfection of primary quiescent cells. The self-delivery siRNAs have been shown to be efficient for *in vitro* and *in vivo* inactivation of target genes. However, this approach had been used in a limited number of *in vivo* experiments, having been tested in skin injections to down-regulate various target genes and in intra-peritoneal injections to treat an animal model of ovarian cancer [10-13]. This type of approach had never been used to silence gene expression in peripheral nerves before. By this mean, we were able to confirm that Egr2 silencing results in active demyelination in the absence of non-specific effect of the siRNAs (no significant demyelination after treatment with non-targeting siRNAs). Our results confirm by a completely different technique the findings of Decker et al., suggesting

that peripheral myelin maintenance is a dynamic phenomenon requiring constant expression of Egr2 in the peripheral nervous system [6].

These results also constitute a proof of concept for the use of self-delivery siRNAs to silence various genes in peripheral nerve Schwann cells *in vivo*, without the need for transgenic animals. Another mean to down-regulate specific mRNAs in peripheral nerves could have been to use small hairpin RNA (shRNAs) plasmids delivered by lentiviral particles into the peripheral nerves. We did not test this approach because it was previously shown that in adult nerves, lentiviral vectors were not efficient, as very few cells were infected [23]. The siRNA-induced demyelination we performed could also constitute a clever model of peripheral nerve demyelination, because chemically-induced PNS demyelination also results in significant axonal injury because of non-specific toxic effect of the chemical agents (as is the case with lyso-phosphatidyl-choline).

We finally tested whether the microRNA-processing enzyme Dicer could be involved in peripheral myelin maintenance. It was previously shown that Dicer inactivation results in defective peripheral nerve myelination [14-18]. This led us to speculate that the persistent expression of Dicer mRNA in the peripheral nerves (which is mostly attributable to its expression by Schwann cells) could also be necessary for adequate peripheral myelin maintenance. After showing that anti-Dicer siRNAs are able to down-regulate the target mRNA in cell cultures, we injected the siRNAs in rat sciatic nerves, which resulted here again in active demyelination. By contrast with Egr2, which is only expressed by Schwann cells in the peripheral nervous system, we cannot rule out that anti-Dicer siRNAs could also target Dicer in neurons, which could indirectly contribute to the observed demyelination through perturbed axon-Schwann cell interactions. Whatever the case, our results show that constant expression of Dicer in the peripheral nerves is necessary for peripheral myelin maintenance. This suggests that this process is (at least in part) controlled by specific miRNAs, which could

down-regulate genes associated with the immature stage of Schwann cells. This area of research is currently under investigation in our laboratory.

A question remains regarding the relatively moderate demyelinating effect of anti-Egr2 siRNAs in co-cultures of DRG neurons and Schwann cells. The down-regulation of Egr2 in co-cultures of neurons and Schwann cells did not result in a complete demyelination but rather in a partial demyelinating effect, the myelin sheaths appearing as irregular and less intensely stained by anti-MBP antibodies. This has to be related to the fact that DRG co-cultures might not be a very good model for peripheral myelin maintenance. Over the time, new axons continue to develop from cultured neurons and new myelin sheaths are formed, which may represent a protracted myelination process rather than the maintenance of stable myelin sheaths. In addition, the level of inhibition of Egr2 in these co-cultures (about two thirds of basal level) could be insufficient to impair myelin maintenance in the absence of “adjuvant” demyelinating agents, such as macrophages which contribute to demyelination in peripheral nerves.

In conclusion, our results confirm the central role of Egr2 constant expression in peripheral myelin maintenance and demonstrate that Dicer expression is required for myelin maintenance in adult rat sciatic nerves. Experimental studies are underway to determine which miRNAs are involved in the regulation of this dynamic phenomenon. Our results also constitute a proof of concept for the use of self-delivery siRNAs to investigate the molecular mechanisms of myelin maintenance *in vivo* and suggest that this simple technique could be a versatile means to induce a gene-driven demyelination “on demand” in peripheral nerves.

References

1. Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi AB, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P (1994) Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* 371: 796–799.
2. Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG, Lupski JR (1998) Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* 18: 382–384.
3. Timmerman V, De Jonghe P, Ceuterick C, De Vriendt E, Lofgren A, Nelis E, Warner LE, Lupski JR, Martin JJ, Van Broeckhoven C (1999) Novel missense mutation in the early growth response 2 gene associated with Dejerine-Sottas syndrome phenotype. *Neurology* 52: 1827–1832.
4. Woodhoo A, Alonso MB, Droggiti A, Turmaine M, D’Antonio M, Parkinson DB, Wilton DK, Al-Shawi R, Simons P, Shen J, Guillemot F, Radtke F, Meijer D, Feltri ML, Wrabetz L, Mirsky R, Jessen KR (2009) Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nat Neurosci* 12: 839-847.
5. Ghislain J, Charnay P (2006) Control of myelination in Schwann cells: a Krox20 cis regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Rep* 7: 52–58.
6. Decker L, Desmarquet-Trin-Dinh C, Taillebourg E, Ghislain J, Vallat JM, Charnay P (2006). Peripheral Myelin Maintenance Is a Dynamic process Requiring Constant Krox20 Expression. *J Neurosci* 26: 9771–9779.
7. Canu MH, Carnaud M, Picquet F, Goutebroze L (2009) Activity-dependent regulation of myelin maintenance in the adult rat. *Brain Res* 1252: 45–51.
8. Bremer J, Baumann F, Tiberi C, Wessig C, Fischer H, Schwarz P, Steele AD, Toyka KV, Nave KA, Weis J, Aguzzi A (2010) Axonal prion protein is required for peripheral myelin maintenance. *Nat Neurosci* 13: 310–318.

9. Bremer M, Fröb F, Kichko T, Reeh P, Tamm ER, Suter U, Wegner M (2011) Sox10 is required for Schwann-cell homeostasis and myelin maintenance in the adult peripheral nerve. *Glia* 59: 1022–1032.
10. Gonzalez-Gonzalez E, Speaker TJ, Hickerson RP, Spitler R, Flores MA, Leake D, Contag CH and Kaspar RL (2010) Silencing of Reporter Gene Expression in Skin Using siRNAs and Expression of Plasmid DNA Delivered by a Soluble Protrusion Array Device (PAD) *Mol Ther* 18: 1667–1674.
11. Hickerson RP, Flores MA, Leake D, Lara MF, Contag CH, Leachman SA and Kaspar RL (2011) Use of Self-Delivery siRNAs to Inhibit Gene Expression in an Organotypic Pachyonychia Congenita. *J Invest Dermatol* 131: 1037–1044.
12. Lara MF, Gonzalez-Gonzalez E, Speaker TJ, Hickerson RP, Leake D, Milstone LM, Contag CH, and Kaspar RL (2012) Inhibition of CD44 Gene Expression in Human Skin Models, Using Self-Delivery Short Interfering RNA Administered by Dissolvable Microneedle Arrays. *Hum Gene Ther* 23: 816–823.
13. DiFeo A, Huang F, Sangodkar J, Terzo EA, Leake D, Narla G and Martignetti JA. (2009) KLF6-SV1 Is a Novel Antiapoptotic Protein That Targets the BH3- Only Protein NOXA for Degradation and Whose Inhibition Extends Survival in an Ovarian Cancer Model *Cancer Res* 69: 4733-4741.
14. Pereira JA, Baumann R, Norrmén C, Somandin C, Mieke M, Jacob C, Lühmann T, Hall-Bozic H, Mantei N, Meijer D, Suter U. (2010) Dicer in Schwann cells is required for myelination and axonal integrity. *J Neurosci* 30 : 6763-6775.
15. Yun B, Anderegg A, Menichella D, Wrabetz L, Feltri ML, and Awatramani R. (2010) MicroRNA-Deficient Schwann Cells Display Congenital Hypomyelination. *J Neurosci* 30: 7722–7728.

16. Verrier JD, Semple-Rowland S, Madorsky I, Papin JE, and Notterpek L (2010) Reduction of Dicer Impairs Schwann Cell Differentiation and Myelination. *J Neurosci Res* 88: 2558–2568.
17. Bremer J, O'Connor T, Tiberi C, Rehrauer H, Weis J, Aguzzi A (2010) Ablation of Dicer from Murine Schwann Cells Increases Their Proliferation while Blocking Myelination. *PLoS One* 5: e12450.
18. Pereira JA, Baumann R, Norrme C, Somandin C, Miehe M, Jacob C, Tessa Luhmann T, Hall-Bozic H, Mantei N, Meijer D and Suter U (2010) Dicer in Schwann Cells Is Required for Myelination and Axonal Integrity. *J Neurosci* 30: 6763–6775.
19. Svenningsen A.F, Shan W.S, Colman D.R, Pedraza L (2003) Rapid Method for Culturing Embryonic Neuron–Glial Cell Cocultures. *J Neurosci Res* 72: 565–573.
20. Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real- Time Quantitative PCR and the $2^{\Delta\Delta C_T}$ Method. *Methods* 25: 402–408.
21. Topilko P, Levi G, Merlo G, Mantero S, Desmarquet C, Mancardi G, Charnay P (1997) Differential regulation of the zinc finger genes Krox-20 and Krox-24 (Egr-1) suggests antagonistic roles in Schwann cells. *J Neurosci Res* 50: 702–712.
22. Murphy P, Topilko P, Schneider-Maunoury S, Seitanidou T, Baron-Van Evercooren A, Charnay P (1996) The regulation of Krox-20 expression reveals important steps in the control of peripheral glial cell development. *Development* 122:2847–2857.
23. Özcelik M, Cotter L, Jacob C, Pereira JA, Relvas J, Suter U, and Tricaud N (2010) Pals1 Is a Major Regulator of the Epithelial-Like Polarization and the Extension of the Myelin Sheath in Peripheral Nerves. *J Neurosci* 30:4120–4131.

Figure Legends

Figure 1: Real-Time qPCR quantification of Egr2 expression three days after treatment with self-delivery siRNAs.

The level of expression of Egr2 (relative to Gapdh) was normalized to the mean expression level in the absence of siRNAs. Treatment with non targeting siRNAs resulted in no significant effect on Egr2 expression, whereas anti-Egr2 siRNAs induced a 63% decrease in Egr2 level.

Figure 2: Effect of siRNAs on myelin sheath in neuron-Schwann cell co-cultures

Cocultures were treated with siRNAs targeting Egr2 or non targeting siRNAs. Myelin sheath integrity was assessed by using immuno-fluorescence staining of Major Basic Protein (MBP). After 3 days of treatment, co-cultures treated with anti Egr2 siRNAs showed a weaker and irregular MBP staining (A, B), when compared to co-cultures treated with non targeting siRNAs (C, D).

Figure 3. Immunohistochemistry of Myelin Protein Zero (P₀) and CD68 in rat sciatic nerves injected with anti-Egr2 and control non-targeting siRNAs.

A. P₀ staining of a sciatic nerve injected with control siRNA, showing a homogeneous staining of myelin sheaths with no areas of demyelination (5 days after injection). B. 3 days after injection of anti-Egr2 siRNAs, presence of a demyelinated area of limited size (lack of brown P₀ staining, arrows). C. Five days after injection of anti-Egr2 siRNAs, presence of a larger area of demyelination (arrows). D. One day after injection of anti-Egr2 siRNAs, absence of CD68 staining, indicating an absence of macrophages in the injected nerve. E. 3 days after injection of anti-Egr2 siRNAs (same nerve as in panel B), presence of CD68-positive macrophages in the demyelinated area. F. 5 days after injection of anti-Egr2 siRNAs

(same nerve as in panel C), presence of a higher number of CD68-positive macrophages in the large area of demyelination.

Figure 4: Semi-thin sections of adult rat sciatic nerves five days after injection of siRNAs.

Injection of 30 μ L of non-targeting siRNAs resulted in either no effect (A, absence of demyelination) or in a slight localized demyelination (B, arrows). Injection of 30 μ L of anti-Egr2 siRNAs results in a marked area of demyelination (C, arrows).

Figure 5: Ultrastructural study of nerves injected with anti-Egr2 siRNAs.

A. After five days of treatment with anti-Egr2 siRNAs, presence of various types of demyelinating features within the lesion: myelinated fiber with a near-normal appearance (white arrowhead), actively demyelinating fiber (white arrow) and macrophages, loaded with myelin debris (black arrows); B: five days after injection of anti-Egr2 siRNAs, several large axons appear as demyelinated (absence of myelin sheaths, black arrows), whereas a few other still remain myelinated (white arrows); C (detail of panel B): presence of a macrophage loaded with myelin debris immediately adjacent to a demyelinated axon.

Figure 6: Effect of siRNAs targeting Dicer on gene expression and myelin maintenance.

A. Treatment of DRG neuron-Schwann cell co-cultures with anti-Dicer siRNAs results in a 72% decrease of Dicer mRNA. B. On the semi-thin transverse section of a sciatic nerve 5 days after injection of anti-Dicer siRNAs, presence of a large area of demyelination. C-D: Ultra-thin sections after injection of anti-Dicer siRNAs. Five days after injection of anti-Dicer siRNAs, presence of many large demyelinated (nude) axons (black arrows), together with macrophages loaded with myelin debris (white arrows).

Supplementary figure 1. Injection of siRNAs in the endoneurium of an adult rat sciatic nerve using a micro-syringe.

Tables

Table 1. Oligonucleotide primers used for RT-qPCR

Gapdh	
Forward primer	TGCACCACCAACTGCTTAG
Reverse primer	GGATGCAGGGATGATGTT
Hprt	
Forward primer	CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC
Reverse primer	GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC
Egr2	
Forward primer	CAGTACCCTGGTGCCAGCTG
Reverse primer	TGTGGATCTCTCTGGCACGG
Dicer	
Forward primer	GAGTCTCTTGCTGGTGCCAT
Reverse primer	CGCCTGTGAGTCTGGAAGC

Table2. Self-delivery siRNA nucleotide sequences

Dicer	
Sequence 1	5'CCCCUAUCGUGAAAUUAUG 3'(13546.4 g/mol)
Sequence 2	5'CCAGGAUCCACAAAACGAA 3' (13514.0 g/mol)
Sequence 3	5'UGAUCAGCCUCAUCGAUUU 3' (13572.2 g/mol)
Sequence 4	5'GUCUGAAGCUCGUUAUAGGC 3' (13566.6 g/mol)
Egr2	
Sequence 1	5'CCAGAAGGCAUCAUCAUA 3' (13510.8 g/mol)
Sequence 2	5'CUGACUUGUUUGGUUAUUA 3' (13546.3 g/mol)
Sequence 3	5' GGUUUAAGUAUGGCUGUAU 3' (13535.2 g/mol)
Sequence 4	5' CCAGUAACUCUCAGUGGUU 3' (13561.4 g/mol)

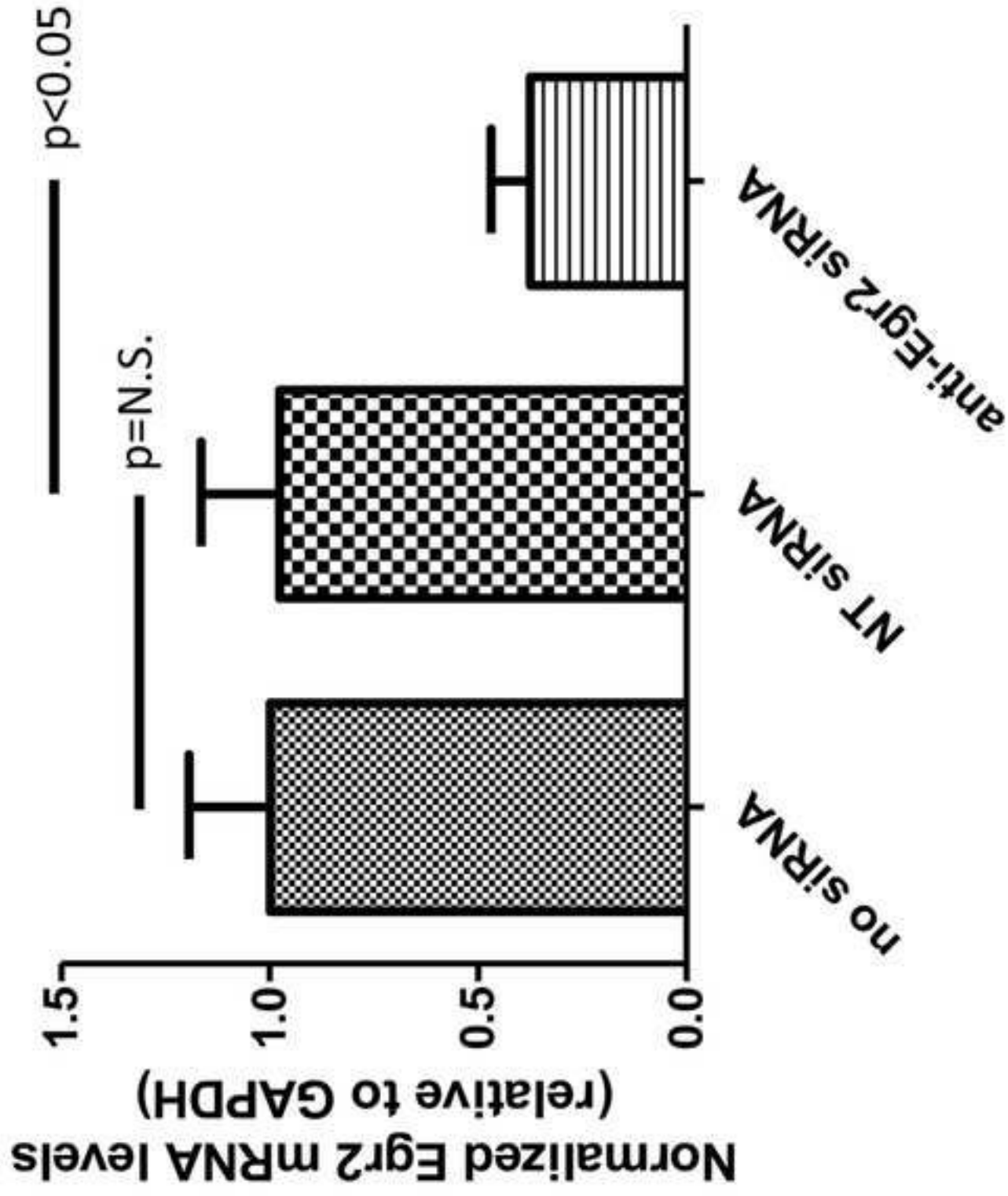


Figure 1

Figure 2

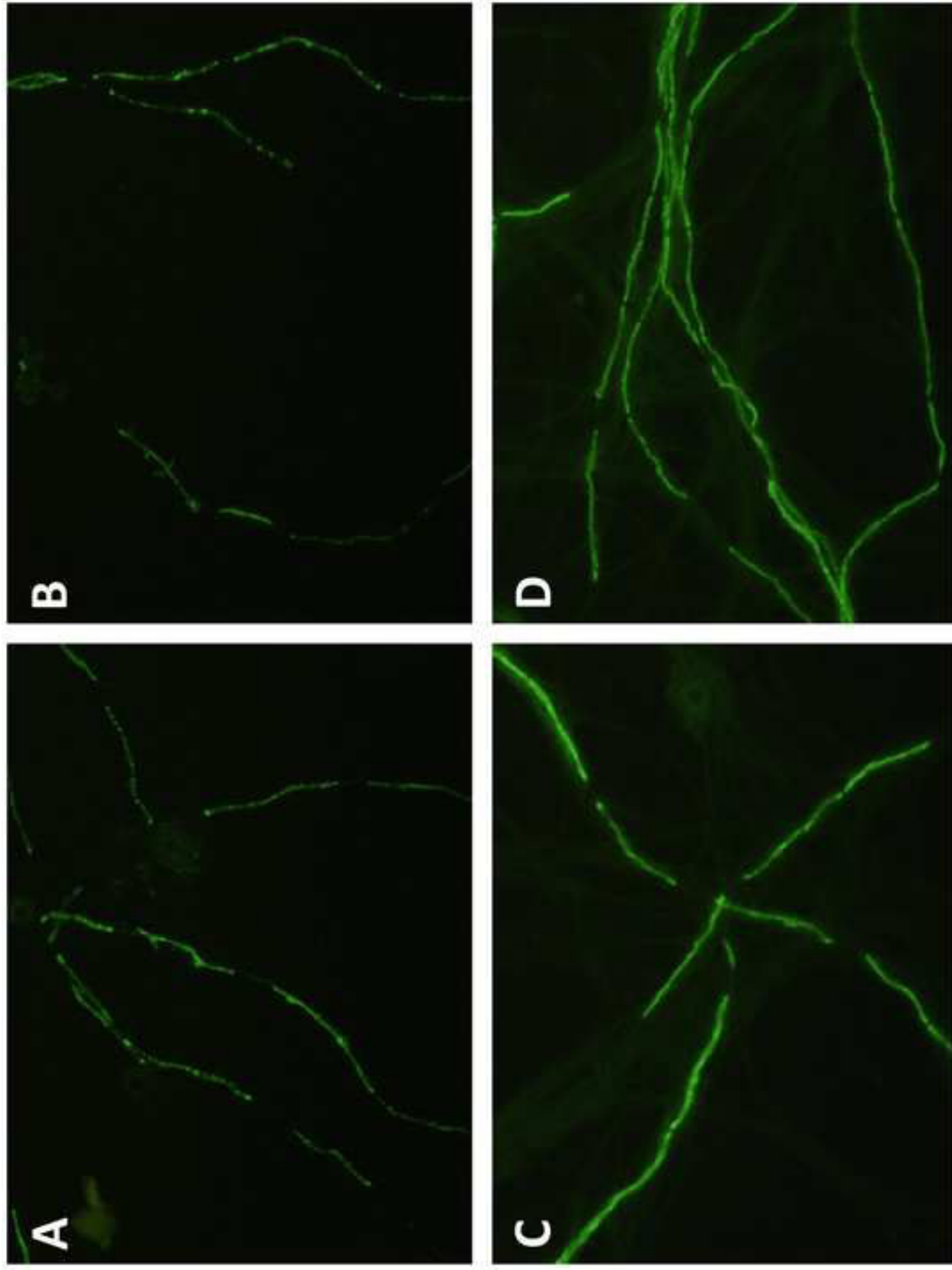


Figure 3

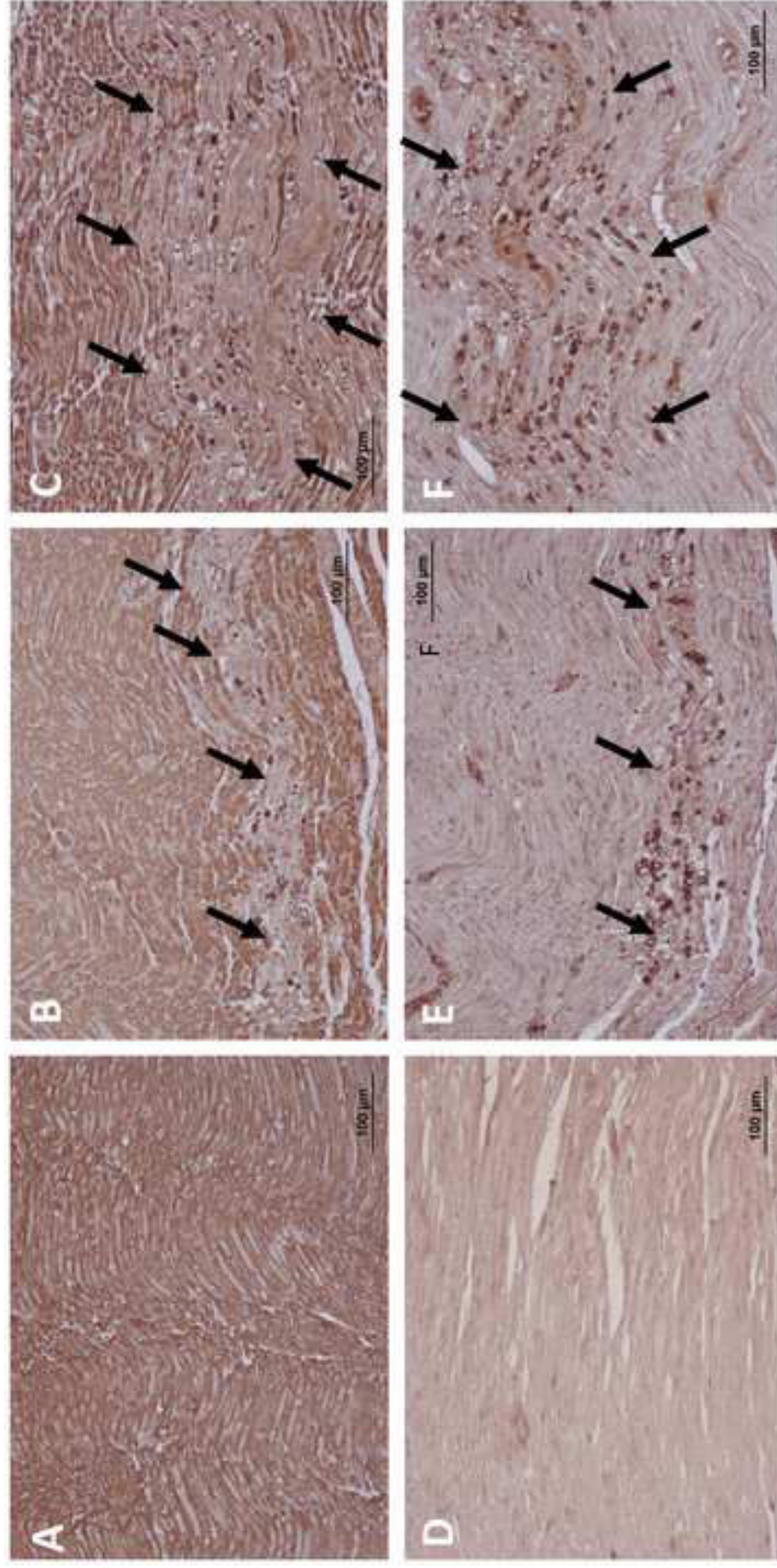


Figure 4

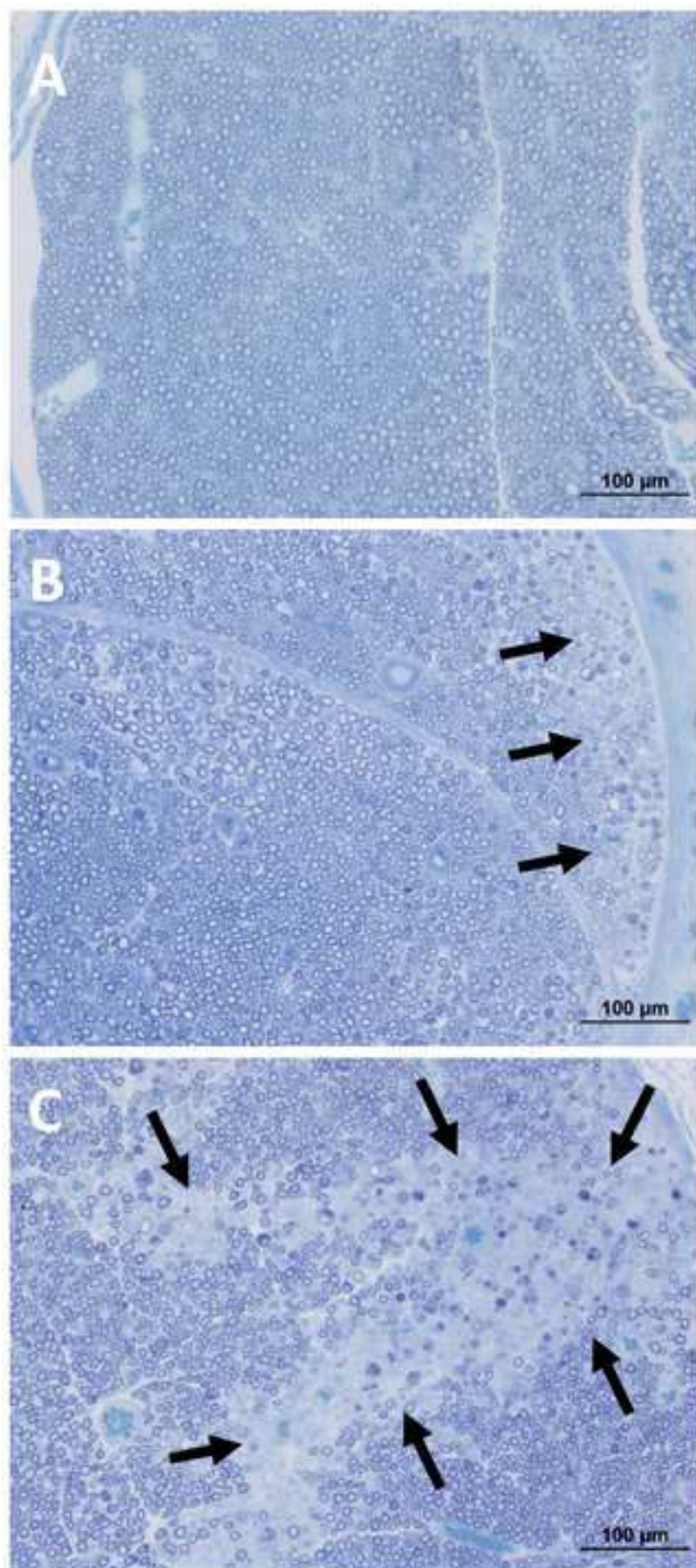


Figure 5

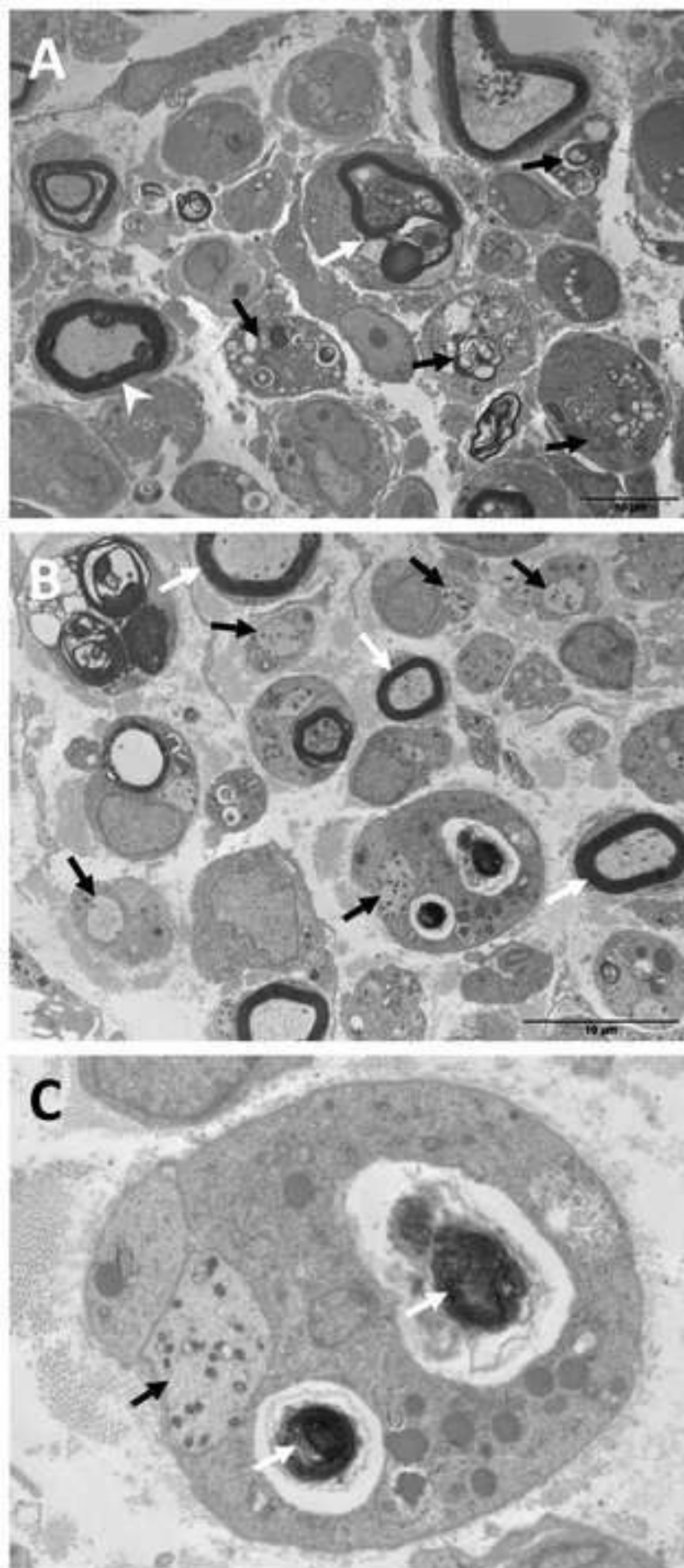
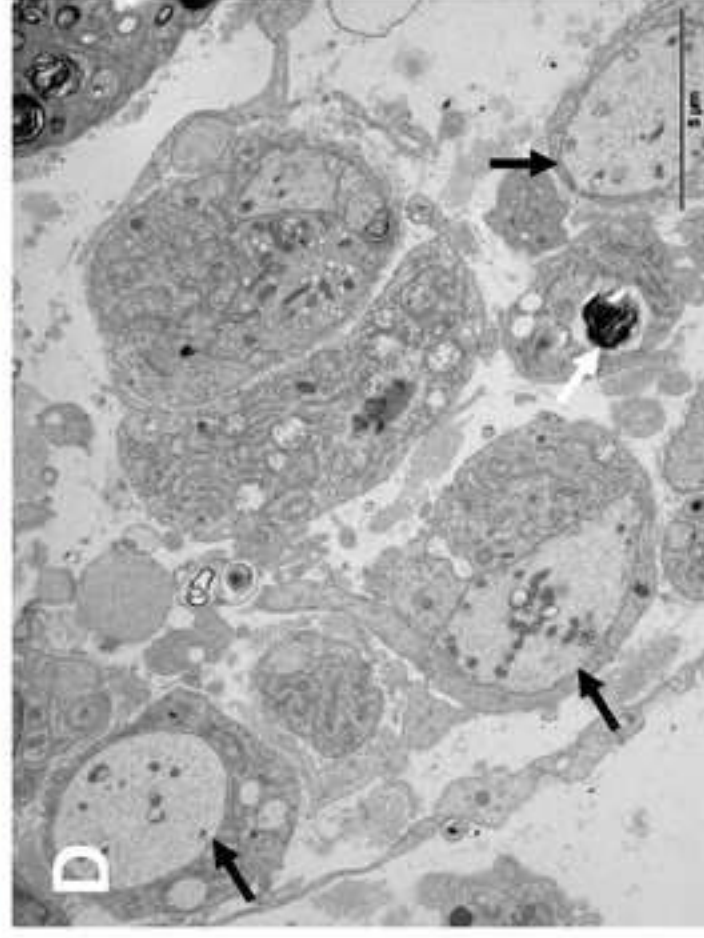
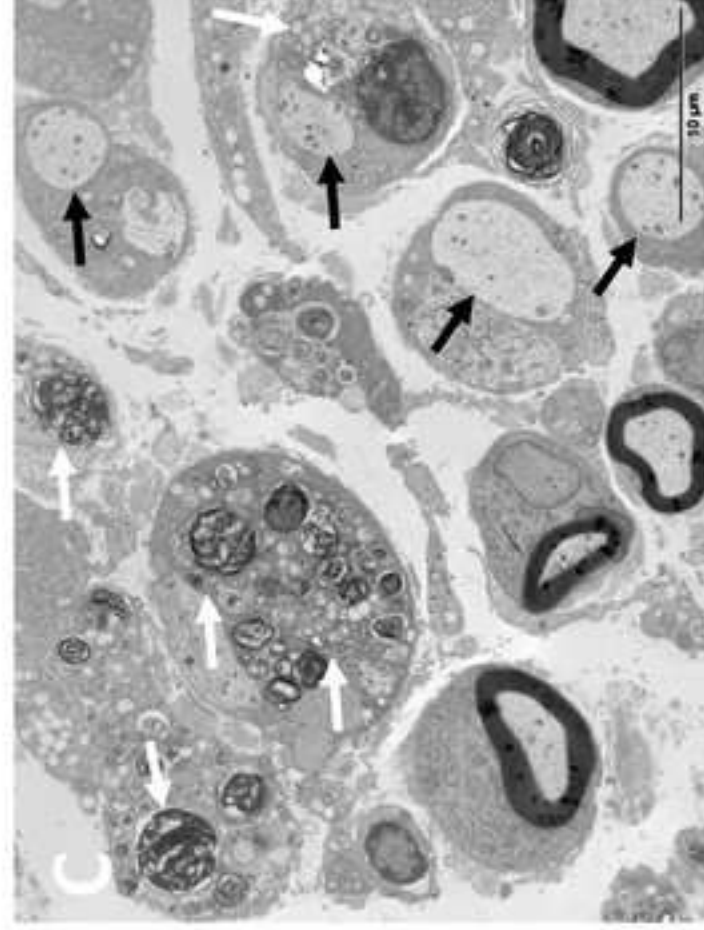
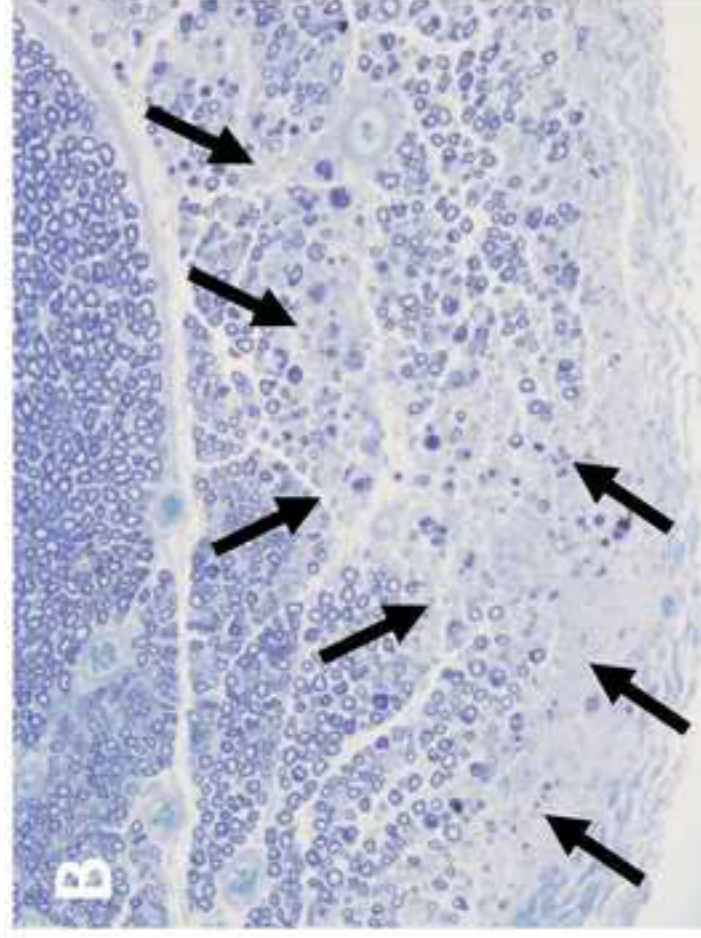
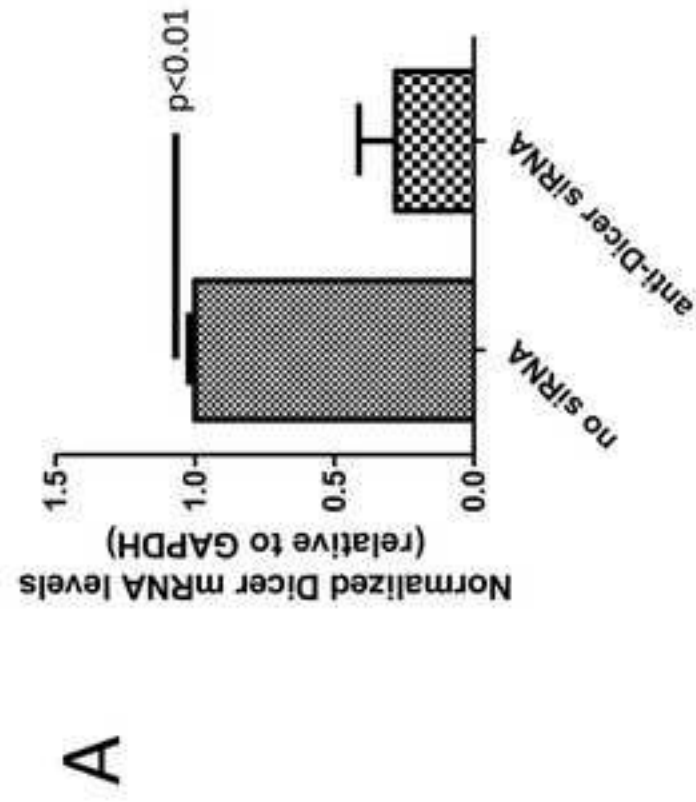


Figure 6



CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Nos résultats confirment le rôle central de l'expression constante d'EGR2 dans la maintenance de la myéline périphérique et démontrent que l'expression de Dicer est nécessaire pour la maintenance de la myéline dans les nerfs sciatiques de rat adulte. Des études expérimentales sont en cours pour déterminer si les miARN sont impliqués dans la régulation de ce phénomène dynamique. Nos résultats constituent également une preuve de concept pour l'utilisation des siARN pour étudier les mécanismes moléculaires de la maintenance de la myéline in vivo et suggèrent que cette technique simple pourrait être un moyen polyvalent pour induire une démyélinisation « à la demande » dans les nerfs périphériques. Il serait intéressant d'envisager des études sur les thérapies potentielles permettant de moduler l'expression d'EGR2 dans les neuropathies périphériques.

Bibliographie

Aagaard L, Rossi JJ 2007. RNAi therapeutics: principles, prospects and challenges, *Adv. Drug.Deliv. Rev.* **59**: 75–86.

Adlkofer K, Lai C 2000. Role of neuregulins in glial cell development. *Glia* **29**:104–111.

Adlkofer K, Frei R, Neuberg DH, Zielasek J, Toyka KV. & Suter U. 1997. Heterozygous peripheral myelin protein 22 deficient mice are affected by progressive demyelination tomaculous neuropathy. *J Neurosci* **17**: 4662–4671.

Adlkofer K, Martini R, Aguzzi A, Zielasek J, Toyka KV, and Suter U. 1995. demyelinating peripheral neuropathy in Pmp22-deficient mice. *Nat. Genet.* **11**:274–280.

Alenghat FJ, Nauli SM, Kolb R, Zhou J, Ingber DE. 2004. Global cytoskeletal control of mechanotransduction in kidney epithelial cells. *Exp Cell Res* **301**: 23–30.

Alessandri-Haber N, Dina OA, Yeh JJ, Parada CA, Reichling DB, et al. 2004. Transient receptor potential vanilloid 4 is essential in chemotherapy-induced neuropathic pain in the rat. *J Neurosci* **24**: 4444–4452.

Alessandri-Haber N, Joseph E, Dina OA, Liedtke W, Levine JD. 2005. TRPV4 mediates pain-related behavior induced by mild hypertonic stimuli in the presence of inflammatory mediator. *Pain* **118**: 70–79.

Alessandri-Haber N, Yeh JJ, Boyd AE, Parada CA, Chen X, et al. 2003. Hypotonicity induces TRPV4-mediated nociception in rat. *Neuron* **39**: 497–511.

Amato A. A & Barohn R. J. 1996. Hereditary neuropathy with liability to pressure palsies: association with central nervous system and proliferation in breast cancer cells via a double-stranded RNA-dependent protein kinase-dependent mechanism *J. Immunol.* (Baltimore, Md.: 1950). **180** : 7125–7133

Andrade YN, Fernandes J, Va'zquez E, Ferna'ndez-Ferna'ndez JM, Arniges M, et al. 2005. TRPV4 channel is involved in the coupling of fluid viscosity changes to epithelial ciliary activity. *J Cell Biol* **168**: 869–874.

Antonellis A, Ellsworth R. E, Sambuughin N, Puls I, Abel A.& Lee-Lin S. Q. et al. 2003. Glycyl tRNA synthetase mutations in Charcot-Marie-Tooth disease type 2D and distal spinal muscular atrophy type V. *Am J Hum Genet* **72**: 1293–1299.

Araki T, Nagarajan R, Milbrandt J. 2001. Identification of genes induced in peripheral nerve after injury. Expression profiling and novel gene discovery. *J Biol Chem* **276**:34131–34141.

Armstrong M.E, Gantier M, Li L, Chung W.Y, Mccann A, Baugh J.A, Donnelly S.C 2008. Small interfering RNAs induce macrophage migration inhibitory factor production and proliferation in breast cancer cells via a double-stranded RNA dependent protein kinase-dependant mechanism. *J immunol.* **180** 7125-7133

Arniges M, Va'zquez E, Ferna'ndez-Ferna'ndez JM, Valverde MA. 2004. Swelling-activated Ca²⁺ entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia. *J Biol Chem* **279**: 54062–54068

Arroyo E.J, and Scherer S.S. 2000. On the molecular architecture of myelinated fibers. *Histochem. Cell. Biol.* **113**: 1–18

Auer-Grumbach M, Mauko B, Auer-Grumbach P. & Pieber T. R. 2006. Molecular Genetics of Hereditary Sensory Neuropathies. *Neuromolecular Med* **8**: 147–158.

Azuma T, Ao S, Saito Y, Yano K, Seki N, Wakao H, Masuho Y, Muramatsu M. 1999. Human SOX11, an upregulated gene during the neural differentiation, has a long 3' untranslated region. *DNA Res.* **6**: 357–360.

Baas PW, Ahmad FJ. 2001 Force generation by cytoskeletal motor proteins as a regulator of axonal elongation and retraction. *Trends Cell Biol* **11**: 244–249.

Baranek C, Sock E, Wegner M. 2005. The POU protein Oct-6 is a nucleocytoplasmic shuttling protein. *Nucleic Acids Res* **33**:6277–6286.

Becker D, Blase C, Bereiter-Hahn J, Jendrach M. 2005. TRPV4 exhibits a functional role in cell-volume regulation. *J Cell Sci* **118**: 2435–2440.

Benfenati V, Amiry-Moghaddam M, Caprini M, Mylonakou MN, Rapisarda C, et al. 2007. Expression and functional characterization of transient receptor potential vanilloid-related channel 4 (TRPV4) in rat cortical astrocytes. *Neuroscience* **148**: 876–892.

Bennett C. L, Shirk A. J, Huynh H. M, Street V. A, Nelis E. & Van Maldergem L. 2004. Simple mutation in demyelinating neuropathy and distribution in sciatic nerve. *Ann Neurol* **55**: 713–720.

Benninger Y, Thurnherr T, Pereira JA, Krause S, Wu X, Chrostek-Grashoff A, Herzog D, Nave KA, Franklin RJ, Meijer D, Brakebusch C, Suter U, Relvas JB 2007. Essential and distinct roles for cdc42 and rac1 in the regulation of Schwann cell biology during peripheral nervous system development. *J Cell Biol* **177**:1051–1061.

Bergoffen J, Scherer S. S, Wang S, Oronzi Scott M, Bone L. J. & Paul D. L. (1993) Connexin mutations in X-linked Charcot- Marie-Tooth disease. *Science* **262**: 2039–2042.

Bergsland M, Werme M, Malewicz M, Perlmann T, Muhr J, 2006. The establishment of neuronal properties is controlled by Sox4 and Sox11. *Genes Dev.* **20**: 3475–3486.

Birmingham JR Jr, Shearin H, Pennington J, O'Moore J, Jaegle M, Driegen S, van Zon A, Darbas A, Ozkaynak E, Ryu EJ, Milbrandt J, Meijer D. 2006. The claw paw mutation reveals a role for Lgi4 in peripheral nerve development. *Nat Neurosci* **9**:76–84.

Birmingham JR Jr, Shumas S, Whisenhunt T, Sirkowski EE, O'Connell S, Scherer SS, Rosenfeld MG. 2002. Identification of genes that are downregulated in the absence of the POU domain transcription factor pou3f1 (Oct-6, Tst-1, SCIP) in sciatic nerve. *J Neurosci* **22**:10217–10231.

- Bermingham J.R Jr, S.S. Scherer S, O'Connell E, Arroyo K.A, Kalla F.L, Powell, and Rosenfeld M.G. 1996. Tst-1/Oct-6/SCIP regulates a unique step in peripheral myelination and is required for normal respiration. *Genes Dev.* **10**:1751–1762.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. 2001. Role for abidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**:363–366
- Bhaskaran A, Parkinson DB, Mirsky R, Jessen KR. 2007. Schwann cell myelination is inhibited by c-Jun and p38 mitogen activated protein kinase pathways. *Neuron Glia Biol* **3**:S42.
- Birchmeier C, Nave KA. 2008. Neuregulin-1, a key axonal signal that drives Schwann cell growth and differentiation. *Glia* **56**:1491–1497.
- Birouk N, Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, Tardieu S. & Maissonobe T. et al. 1997 Charcot-Marie-Tooth disease type1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain* **120 (Pt 5)**: 813–823.
- Bixby S, Kruger GM, Mosher JT, Joseph NM, Morrison SJ 2002. Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity. *Neuron* **35**:643–656.
- Blase C, Becker D, Kappel S, Bereiter-Hahn J 2009. Microfilament dynamics during HaCaT cell volume regulation. *Eur J Cell Biol* **88**: 131–139
- Boerkoel CF, Takashima H & Lupski JR 2002. The genetic convergence of Charcot -Marie-Tooth disease types 1 and 2 and the role of genetics in sporadic neuropathy. *Curr Neurol Neurosci Rep* **2**, 70–77.
- Boerkoel CF, Takashima H, Bacino CA, Daentl D. & Lupski JR. 2001a. EGR2 mutation R359W causes a spectrum of Dejerine-Sottas neuropathy. *Neurogenetics* **3**, 153–7.
- Boison D, and Stoffel W. 1994. Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**:11709–11713.
- Bondurand N, Girard M, Pingault V, Lemort N, Dubourg O, Goossens M. 2001. Human Connexin 32, a gap junction protein altered in the X-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease, is directly regulated by the transcription factor SOX10. *Hum Mol Genet* **10**:2783–2795.
- Bosse F, Hasenpusch-Theil K, Küry P, Müller HW 2006. Gene expression profiling reveals that peripheral nerve regeneration is a consequence of both novel injury-dependent and reactivated developmental processes. *J Neurochem* **96**:1441–1457.
- Boudreau RL, Monteys AM, Davidson BL. 2008. Minimizing variables among hairpinbased RNAi vectors reveals the potency of shRNAs, *RNA* **14**: 1834–1844.

Bradley SP, Kowalik TF, Rastellini C, da Costa MA, Bloomenthal AB, Cicalese L, Basadonna GP, Uknis ME. 2005a. Successful incorporation of short-interfering RNA into islet cells by in situ perfusion. *Transplant Proc* **37**:233–236

Bradley WG, Jenkison M. 1973. Abnormalities of peripheral nerves in murine muscular dystrophy. *J Neurol Sci* **18**:227–247

Brennan A, Dean CH, Zhang AL, Cass DT, Mirsky R, Jessen KR 2000. Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo. *Dev Biol* **227**:545–557.

Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL and Iggo R 2003. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* **34**:263–264

Britsch S, Goerich DE, Riethmacher D, Peirano RI, Rossner M, Nave KA, Birchmeier C, Wegner M 2001. The transcription factor Sox10 is a key regulator of peripheral glial development. *Genes Dev* **15**:66–78.

Bron R, Vermeren M, Kokot N, Andrews W, Little GE, Mitchell KJ, Cohen J. 2007. Boundary cap cells constrain spinal motor neuron somal migration at motor exit points by a semaphorin-plexin mechanism. *Neural Develop* **2**:21.

Buchstaller J, Sommer L, Bodmer M, Hoffmann R, Suter U, Mantei N. 2004. Efficient isolation and gene expression profiling of small numbers of neural crest stem cells and developing Schwann cells. *J Neurosci* **24**:2357–2365.

Bunge MB, Williams AK, Wood PM 1982. Neuron–Schwann cell interaction in basal lamina formation. *Dev Biol* **92**:449–460.

Bunge RP, Bunge MB. 1983. Interrelationship between Schwann cell function and extracellular matrix production. *Trends Neurosci* **6**:499–505.

Cantiello HF, Prat AG, Bonventre JV, Cunningham CC, Hartwig JH, et al. 1993. Actin-binding protein contributes to cell volume regulatory ion channel activation in melanoma cells. *J Biol Chem* **268**: 4596–4599.

Capasso M, Di Muzio A, Ferrarini M, De Angelis MV, Caporale CM. & Lupo S. et al. 2004. Inter-nerves and intra-nerve conduction heterogeneity in CMTX with Arg (15) Gln mutation. *Clin Neurophysiol* **115**, 64–70. *Cells. Dev Biol* **246**:245–258.

Chen CS (2008) Mechanotransduction - a field pulling together? *J Cell Sci* **121**: 3285–3292

Chen LM, Bailey D, Fernandez-Valle C. 2000. Association of beta 1 integrin with focal adhesion kinase and paxillin in differentiating Schwann cells. *J Neurosci* **20**:3776–3784.

Chen ZL, Strickland S. 2003. Laminin gamma1 is critical for Schwann cell differentiation, axon myelination, and regeneration in the peripheral nerve. *J Cell Biol* **163**:889–899.

Chen ZL, Yu WM, Strickland S (2007). Peripheral regeneration. *Ann Rev Neurosci* **30**:209–233.

- Cheung M, Abu-Elmagd M, Clevers H, Scotting PJ, 2000. Roles of Sox4 in central nervous system development. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 79, 180–191.
- Chung KW, Kim SB, Park KD, Choi KG, Lee JH. & Eun HW. et al. (2006) Early onset severe and late-onset mild Charcot- Marie-Tooth disease with mitofusin 2 (MFN2) mutations. *Brain* **129**(Pt 8), 2103–2118.
- Ciutat D, Caldero J, Oppenheim RW, Esquerda JE (1996). Schwann cell apoptosis during normal development and after axonal degeneration induced by neurotoxins in the chick embryo. *J Neurosci* **16**:3979–3990.
- Clark MB, Bunge MB 1989. Cultured Schwann cells assemble normal-appearing basal lamina only when they ensheath axons. *Dev Biol* **133**:393–404.
- Collins RE, Cheng X 2005. Structural domains in RNAi. *FEBS Lett* **579**:5841–5849
- Colman D.R, Kreibich G, Frey AB, and Sabatini DD. 1982. Synthesis and incorporation of myelin polypeptides into CNS myelin. *J. Cell Biol.* **95**:598–608.
- Colognato H, Yurchenco PD. 2000. Form and function: The laminin family of heterotrimers. *Dev Dynamics* **218**:213–234
- Cornélie S, Hoebeke J, Schacht A.M, Bertin B, Vicogne J, Capron M, Riveau G. 2004. Direct evidence that toll-like receptor 9 (TLR9) functionally binds plasmid DNA by correlations in a CMT2B family with refined 3q13-q22 locus. *Neurology* **55**: 1552–1557.
- Cosgaya JM, Chan JR, Shooter EM. 2002. The neurotrophin receptor p75^{NTR} as a positive modulator of myelination. *Science* **298**:1245–1248.
- Court FA, Wrabetz L, Feltri ML 2006. Basal lamina: Schwann cells wrap to the rhythm of space-time. *Curr Opin Neurobiol* 16:501–507.
- Cuajungco MP, Grimm C, Heller S 2007. TRP channels as candidates for hearing and balance abnormalities in vertebrates. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 1022–1027
- D’Antonio M, Michalovich D, Paterson M, Droggiti A, Woodhoo A, Mirsky R, Jessen KR 2006a. Gene profiling and bioinformatic analysis of Schwann cell embryonic development and myelination. *Glia* **53**:501–515.
- D’Antonio M, Droggiti A, Feltri ML, Roes J, Wrabetz L, Mirsky R, Jessen KR 2006b. TGFbeta type II receptor signaling controls Schwann cell death and proliferation in developing nerves. *J Neurosci* **26**:8417–8427.
- D’Urso D, Muller HW. 1997. Ins and out of peripheral myelin protein 22: mapping transmembrane topology and intracellular sorting. *J Neurosci Res* **49**:551–562.
- D’Urso D, Ehrhardt P, and Muller HW. 1999. Peripheral myelin protein 22 and protein zero: a novel association in peripheral nervous system myelin. *J. Neurosci.* **19**:3396–3403.

D'Urso D, Brophy PJ, Staugaitis SM, Gillespie CS, Frey AB, Stempak JG, and Colman DR. 1990. Protein zero of peripheral nerve myelin: biosynthesis, membrane insertion, and evidence for homotypic interaction. *Neuron*. **4**:449–460.

Darbas A, Jaegle M, Walbeehm E, van den Burg H, Driegen S, Broos L, Uyl M, Visser P, Grosveld F, Meijer D. 2004. Cell autonomy of the mouse claw paw mutation. *Dev Biol* **272**:470–482.

Darby IA, Bisucci T, Raghoenath S, Olsson J, Muscat GE, Koopman P, 2001. Sox18 is transiently expressed during angiogenesis in granulation tissue of skin wounds with an identical expression pattern to Flk-1 mRNA. *Lab. Invest.* **81**: 937–943.

De Felipe C, Hunt SP. 1994. The differential control of c-Jun expression in regenerating sensory neurons and their associated glial cells. *J Neurosci* **14**:2911–2923.

De Jonghe P, Mersiyanova IV, Nelis E, Del Favero J, Martin JJ. & Van Broeckhoven C. et al. 2001. Further evidence that neurofilament light chain gene mutations can cause Charcot- Marie-Tooth disease type 2E. *Ann Neurol* **49**: 245–249.

Decker L, Desmarquet-Trin-Dinh C, Taillebourg E, Ghislain J, Vallat JM, Charnay P.2006. Peripheral myelin maintenance is a dynamic process requiring constant Krox20 expression. *J Neurosci* **26**:9771–9779.

Denarier E, Forghani R, Farhadi HF, Dib S, Dionne N, Friedman HC, Lepage P, Hudson TJ, Drouin R, Peterson A. 2005. Functional organization of a Schwann cell enhancer. *J Neurosci* **25**:11210–11217.

Desmazieres A, Decker L, Vallat JM, Charnay P, Gilardi-Hebenstreit P. 2008. Disruption of Krox20-Nab interaction in the mouse leads to peripheral neuropathy with biphasic evolution. *J Neurosci* **28**:5891– 5900.

Dong Z, Brennan A, Liu N, Yarden Y, Lefkowitz G, Mirsky R, Jessen KR. 1995. NDF is a neuron-glia signal and regulates survival, proliferation, and maturation of rat Schwann cell precursors. *Neuron* **15**:585–596.

Dong Z, Sinanan A, Parkinson D, Parmantier E, Mirsky R, Jessen KR 1999. Schwann cell development in embryonic mouse nerves. *J Neurosci Res* **56**:334–348.

Doyu M, Sobue G, Ken E, Kimata K, Shinomura T, Yamada Y, Mitsuma T, Takahashi A. 1993. Laminin A, B1, and B2 chain gene expression in transected and regenerating nerves: Regulation by axonal signals. *J Neurochem* **60**:543–551.

Dyck P, Penzo-Mendez A, Wang H, Pedraza C.E, Macklin W.B, Lefebvre V, 2008. The three SoxC proteins–Sox4, Sox11 and Sox12–exhibit overlapping expression patterns and molecular properties. *Nucleic Acids Res.* **36**: 3101–3117.

Dyck PJ, Chance P, Lebo R. & Carney JA. 1993. Hereditary motor and sensory neuropathies. In: *Peripheral Neuropathy* (eds. P. J. Dyck, P. K. Thomas, J. W. Griffin, P. A Low & J. F. Poduslo), pp. 1094–1136. Philadelphia: W.B. Saunders Company.

Dyck PJ, Litchy WJ, Minnerath S, Bird TD, Chance PF. & Schaid DJ. et al. 1994. Hereditary motor and sensory neuropathy with diaphragm and vocal cord paresis. *Ann Neurol* **35**: 608–615.

Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. 2001b. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494–498
Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. 2001a. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* **15**:188–200

Evgrafov O. V, Mersiyanova I, Irobi J, Van Den Bosch L, Dierick I. & Leung C. L. et al. 2004 Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat Genet* **36**: 602–606.

Fawcett JW, Keynes RJ 1990. Peripheral nerve regeneration. *Annu Rev Neurosci* **13**:43–60.

Feltri ML, Graus Porta D, Previtali SC, Nodari A, Migliavacca B, Casseti A, Littlewood-Evans A, Reichardt LF, Messing A, Quattrini A, et al. 2002. Conditional disruption of beta 1 integrin in Schwann cells impedes interactions with axons. *J Cell Biol* **156**:199–209.

Feltri ML, Wrabetz L. 2005. Laminins and their receptors in Schwann cells and hereditary neuropathies. *J Peripher Nerv Syst* **10**:128–143

Feng Y, Press B. & Wandinger-Ness A. 1995. Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* **131**(6 Pt 1), 1435–1452.

Fernandez-Valle C, Fregien N, Wood PM, Bunge MB. 1993. Expression of the protein zero myelin gene in axon-related Schwann cells is linked to basal lamina formation. *Development* **119**:867–880.

Fernandez-Valle C, Gwynn L, Wood PM, Carbonetto S, Bunge MB. 1994. Anti-beta 1 integrin antibody inhibits Schwann cell myelination. *J Neurobiol* **25**:1207–1226.

Fernandez-Valle C, Tang Y, Ricard J, Rodenas-Ruano A, Taylor A, Hackler E, Biggerstaff J, Iacovelli J. 2002. Paxillin binds schwannomin and regulates its density-dependent localization and effect on cell morphology. *Nat Genet* **31**:354–1362.

Fields R.D. and Stevens-Graham B. 2002. New insights into neuron–glia communication. *Science* **298**: 556–562.

Finzsch M, Stolt CC, Lommes P, Wegner M. 2008. Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor alpha expression. *Development* **135**:637–646.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. 1998. Potent and specific genetic interference by doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806–811

Frei R, Motzing S, Kinkelin I, Schachner M, Koltzenburg M, and Martini R. 1999. Loss of distal axons and sensory Merkel cells and features indicative of muscle denervation in hindlimbs of P0-deficient mice. *J. Neurosci.* **19**: 6058–6067.

Friedrich RP, Schlierf B, Tamm ER, Bosl MR, Wegner M. 2005. The class III POU domain protein Brn-1 can fully replace the related Oct- 6 during Schwann cell development and myelination. *Mol Cell Biol* **25**:1821–1829.

Furukawa T, Mukherjee S, Bao ZZ, Morrow E, Cepko CL 2000. Rax, Hes1, and notch1 promote the formation of Muller glia by postnatal retinal progenitor cells. *Neuron* **26**:383–394.

Gaiano N, Nye JS, Fishell G. 2000. Radial glial identity is promoted by Notch1 signaling in the murine forebrain. *Neuron* **26**:395–404.

Gao X, Wu L, O’Neil RG. 2003. Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* **278**: 27129–37.

Garcia-Dominguez M, Gilardi-Hebenstreit P, Charnay P. 2006. PIASxbeta acts as an activator of Hoxb1 and is antagonized by Krox20 during hindbrain segmentation. *EMBO J* **25**:2432–2442.

Garratt AN, Britsch S, Birchmeier C. 2000b. Neuregulin, a factor with many functions in the life of a Schwann cell. *Bioessays* **22**:987–996.

Garratt AN, Voiculescu O, Topilko P, Charnay P, Birchmeier C. 2000a. A dual role of erbB2 in myelination and in expansion of the Schwann cell precursor pool. *J Cell Biol* **148**:1035–1046

Ge W, Martinowich K, Wu X, He F, Miyamoto A, Fan G, Weinmaster G, Sun YE. 2002. Notch signaling promotes astroglialogenesis via direct CSL-mediated glial gene activation. *J Neurosci Res* **69**:848–860.

Ghazvini M, Mandemakers W, Jaegle M, Piirsoo M, Driegen S, Koutsourakis M, Smit X, Grosveld F, Meijer D. 2002. A cell type-specific allele of the POU gene Oct-6 reveals Schwann cell autonomous function in nerve development and regeneration. *EMBO J* **21**:4612–4620.

Ghislain J, Charnay P. 2006. Control of myelination in Schwann cells: A Krox20 cis-regulatory element integrates Oct6, Brn2 and Sox10 activities. *EMBO Rep* **7**:52–58.

Ghislain J, Desmarquet-Trin-Dinh C, Jaegle M, Meijer D, Charnay P, Frain M. 2002. Characterisation of cis-acting sequences reveals a biphasic, axon-dependent regulation of Krox20 during Schwann cell development. *Development* **129**:155–166.

Giese K.P, Martini R, Lemke G, Soriano P, and Schachner M. 1992. Mouse P0 gene disruption leads to hypomyelination, abnormal expression of recognition molecules, and degeneration of myelin and axons. *Cell*. **71**:565–576.

Gillian AL, Svaren J. 2004. The Ddx20/DP103 dead box protein represses transcriptional activation by Egr2/Krox-20. *J Biol Chem* **279**:9056–9063.

Goswami C, Dreger M, Otto H, Schwappach B, Hucho F. 2006. Rapid disassembly of dynamic microtubules upon activation of the capsaicin receptor TRPV1. *J Neurochem* **96**: 254–266.

- Goswami C, Hucho T. 2008. Submembraneous microtubule cytoskeleton: biochemical and functional interplay of TRP channels with the cytoskeleton. *FEBS J* **275**: 4684–4699.
- Goswami C, Schmidt H, Hucho F. 2007. TRPV1 at nerve endings regulates growth cone morphology and movement through cytoskeleton reorganization. *FEBS J* **274**: 760–772.
- Gradilone SA, Masyuk AI, Splinter PL, Banales JM, Huang BQ, et al. 2007. Cholangiocyte cilia express TRPV4 and detect changes in luminal tonicity inducing bicarbonate secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19138–19143
- Greenfield S, Brostoff S, Eylar E.H, and Morell P. 1973. Protein composition of myelin of the peripheral nervous system. *J. Neurochem.* **20**:1207–1216.
- Griffiths I.R, Mitchell L.S, McPhilemy K, Morrison S, Kyriakides E, and Barrie J.A. 1989. Expression of myelin protein genes in Schwann cells. *J. Neurocytol.* **18**:345–352.
- Grimm D, Streetz K.L, Jopling C.L, Storm T.A, Pandey K, Davis C.R, Marion P, Salazar F, Kay M.A. 2006. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **441**: 537–541.
- Grimpe B, Dong S, Doller C, Temple K, Malouf AT, Silver J. 2002. The critical role of basement membrane-independent laminin gamma 1 chain during axon regeneration in the CNS. *J Neurosci* **22**:3144–3160.
- Grinspan JB, Marchionni MA, Reeves M, Coulaloglou M, Scherer SS. 1996. Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: Neuregulin receptors and the role of neuregulins. *J Neurosci* **16**:6107–6118.
- Grove M, Komiyama NH, Nave KA, Grant SG, Sherman DL, Brophy PJ. 2007. FAK is required for axonal sorting by Schwann cells. *J Cell Biol* **176**:277–282.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Munsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. 1990. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* **346**: 245–250.
- Hagg T, Muir D, Engvall E, Varon S, Manthorpe M. 1989. Laminin-like antigen in rat CNS neurons: Distribution and changes upon brain injury and nerve growth factor treatment. *Neuron* **3**:721–732
- Hahn AF, Brown WF, Koopman WJ & Feasby TE. 1990. Xlinked dominant hereditary motor and sensory neuropathy. *Brain* **113**(Pt 5), 1511–1525.
- Hammer JA, O'Shannessy DJ, DeLeon M, Gould R, Zand D, Daune G, Quarles RH. 1993. Immunoreactivity of PMP22, P0 and other 19 to 28 kDa glycoproteins in peripheral nerve myelin of mammals and fish with HNK-1 and related antibodies. *J Neurochem* **35**:546–558.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. 2000. An RNA-directed nuclease mediates posttranscriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**:293–296

- Han P, McDonald HA, Bianchi BR, Kouhen RE, Vos MH, et al. 2007. Capsaicin causes protein synthesis inhibition and microtubule disassembly through TRPV1 activities both on the plasma membrane and intracellular membranes. *Biochem Pharmacol* **73**: 1635–45.
- Hanemann CO, Bergmann C, Senderek J, Zerres K. & Sperfeld A. 2003. Transient, recurrent, white matter lesions in Xlinked Charcot-Marie-Tooth disease with novel connexin 32 mutation. *Arch Neurol* **60**: 605–609.
- Harding A. E. & Thomas P. K. 1980. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain* **103**: 259–280.
- Hargrave M, Wright E, Kun J, Emery J, Cooper L, Koopman P. 1997. Expression of the Sox11 gene in mouse embryos suggests roles in neuronal maturation and epithelio-mesenchymal induction. *Dev. Dyn.* **210**: 79–86.
- Hayasaka K, Himoro M, Sato W, Takada G, Uyemura K. & Shimizu N. et al. 1993b. Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1B is associated with mutations of the myelin P0 gene. *Nat Genet* **5**: 31–34.
- Hayasaka K, Himoro M, Sawaishi Y, Nanao K, Takahashi T. & Takada G. et al. (1993a) De novo mutation of the myelin P0 gene in Dejerine-Sottas disease (hereditary motor and sensory neuropathy type III). *Nat Genet* **5**: 266–268.
- Heidel JD, Hu S, Liu XF, Triche TJ, Davis ME. 2004. Lack of interferon response in animals to naked siRNAs. *Nat Biotechnol* **22**:1579–1582
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**:1526–1529
- Helbling-Leclerc A, Zhang X, Topaloglu H, Cruaud C, Tesson F, Weissenbach J, Tome FM, Schwartz K, Fardeau M, Tryggvason K, et al. 1995. Mutations in the laminin alpha 2-chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nat Genet* **11**:216–218.
- Henry MD, Campbell KP. 1996. Dystroglycan: An extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* **8**:625–631
- Herr W, Cleary MA. 1995. The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. *Genes Dev* **9**:1679 –1693.
- Hippenmeyer S, Shneider NA, Birchmeier C, Burden SJ, Jessell TM, Arber S. 2002. A role for neuregulin1 signaling in muscle spindle differentiation. *Neuron* **36**:1035–1049.
- Hirata K, Kawabuchi M. 2002. Myelin phagocytosis by macrophages and nonmacrophages during Wallerian degeneration. *Microsc Res Tech* **57**:541–547.
- Hornung V, Guenther-Biller M, Bourquin C, Ablasser A, Schlee M, Uematsu S, Noronha A, Manoharan M, Akira S, de Fougerolles A et al. 2005. Sequence-specific potent induction of

IFN- α by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Nat Med* **11**:263–270

Houlden H, Reilly MM. 2006. Molecular genetics of autosomal-dominant demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* **8**:43–62.

Howe DG, McCarthy KD. 2000. Retroviral inhibition of cAMP-dependent protein kinase inhibits myelination but not Schwann cell mitosis stimulated by interaction with neurons. *J Neurosci* **20**:3513–3521.

Huang WS, Wang JP, Wang T, Fang JY, Lan P, Ma JP. 2007. ShRNA-mediated gene silencing of beta-catenin inhibits growth of human colon cancer cells. *World J gastroenterol* **48**: 6581-6587

Huxley, C., E. Passage, A.M. Robertson, B. Youl, S. Huston, A. Manson, D. Saberan-Djoniedi, D. Figarella-Branger, J.F. Pellissier, P.K. Thomas, and M. Fontes. 1998. Correlation between varying levels of PMP22 expression and the degree of demyelination and reduction in nerve conduction velocity in transgenic mice. *Hum. Mol. Genet.* **7**:449–458.

Indyk JA, Chen Z-L, Strickland S. 2003. Laminin chain expression suggests that laminin-10 is a major isoform in the mouse hippocampus and is degraded by the tPA/plasmin system during excitotoxic injury. *Neurosci* **116**:359–371.

Inoue K, Khajavi M, Ohyama T, Hirabayashi S, Wilson J, Reggin JD, Mancias P, Butler IJ, Wilkinson MF, Wegner M, Lupski JR. 2004. Molecular mechanism for distinct neurological phenotypes conveyed by allelic truncating mutations. *Nat Genet* **36**:361–369.

Ionasescu V. V, Kimura J, Searby C. C, Smith W. L. Jr, Ross M. A. & Ionasescu R. 1996. A Dejerine-Sottas neuropathy family with a gene mapped on chromosome 8. *Muscle Nerve* **19**: 319–323.

Ismailov S. M, Fedotov V. P, Dadali E. L, Polyakov A. V, Van Broeckhoven C. & Ivanov V. I. et al. 2001. A new locus for autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2F) maps to chromosome 7q11–q21. *Eur J Hum Genet* **9**: 646–650.

Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. 2003. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* **21**:635–637

Jaegle M, Ghazvini M, Mandemakers W, Piirsoo M, Driegen S, Levavasseur F, Raghoenath S, Grosveld F, Meijer D. 2003. The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important function in Schwann cell development. *Genes Dev* **17**:1380–1391.

Jaegle M, Mandemakers W, Broos L, Zwart R, Karis A, Visser P, Grosveld F, and Meijer D. 1996. The POU factor Oct-6 and Schwann cell differentiation. *Science*. **273**:507–510.

Janssen E. A, Kemp S, Hensels G. W, Sie O. G, de Die- Smulders C. E. & Hoogendijk J. E. et al. 1997. Connexin32 gene mutations in X-linked dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMTX1). *Hum Genet* **99**: 501–505.

- Jessen KR, Brennan A, Morgan L, Mirsky R, Kent A, Hashimoto Y, Gavrilovic J. 1994. The Schwann cell precursor and its fate: a study of cell death and differentiation during gliogenesis. Jessen KR, Mirsky R. 2003. Embryonic Schwann cell development and the initiation of myelination. In: Myelin and Its Diseases. Lazzarini RA (Ed). *Academic Press*, San Diego, pp 329–370.
- Jessen KR, Mirsky R. 2005. The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nat Rev Neurosci* **6**:671–682.
- Jessen KR, Mirsky R. 2007. Early events in Schwann cell development. In: The Biology of Schwann Cells. Armati PJ (Ed). *Cambridge University Press*, Cambridge, pp 13–36.
- Jones E. A, Jang S. W, Mager G. M, Chang L. W, Srinivasan R, Gokey N. G, Ward R. M, Nagarajan R. and Svaren J. 2007. Interactions of Sox10 and Egr2 in myelin gene regulation. *Neuron Glia Biol.* **3**: 377–387.
- Jordanova A, Irobi J, Thomas F. P, Van Dijck P, Meerschaert K. & Dewil M. et al. 2006. Disrupted function and axonal distribution of mutant tyrosyl-tRNA synthetase in dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Nat Genet* **38**: 197–202.
- Jordanova A, Thomas F. P, Guergueltcheva V, Tournev I, Gondim F. A. A. & Ishpekova B. et al. 2003. Dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth type C maps to chromosome 1p34-p35. *Am J Hum Genet* **73**: 1423–1430.
- Joseph NM, Mukouyama YS, Mosher JT, Jaegle M, Crone SA, Dormand EL, Lee KF, Meijer D, Anderson DJ, Morrison SJ 2004. Neural crest stem cells undergo multilineage differentiation in developing peripheral nerves to generate endoneurial fibroblasts in addition to Schwann cells. *Development* **131**:5599–5612.
- Joseph L. J, Le Beau M. M, Jamieson G. A. Jr, Acharya S, Shows T. B. & Rowley J. D. et al. 1988. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with “zinc-binding finger” structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 7164–7168.
- Judge A, MacLachlan I. 2008 Overcoming the innate immune response to small interfering RNA, *Hum. Gene Ther.* **19**: 111–124.
- Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. 2005. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* **23**:457–462
- Kaazempur Mofrad MR, Abdul-Rahim NA, Karcher H, Mack PJ, Yap B, et al. 2005. Exploring the molecular basis for mechanosensation, signal transduction, and cytoskeletal remodeling. *Acta Biomater* **1**: 281–293.
- Kagawa T, Ikenaka K, Inoue Y, Kuriyama S, Tsujii T, Nakao J, Nakajima K, Aruga J, Okano H, and Mikoshiba K. 1994. Glial cell degeneration and hypomyelination caused by overexpression of myelin proteolipid protein gene. *Neuron*. **13**:427–442.

- Kawakami H, Inoue K, Sakakihara I. & Nakamura S. 2002. Novel mutation in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease associated with CNS impairment. *Neurology* **59**: 923–926.
- Kellerer S, Schreiner S, Stolt CC, Scholz S, Bosl MR, Wegner M. 2006. Replacement of the Sox10 transcription factor by Sox8 reveals incomplete functional equivalence. *Development* **133**:2875–2886.
- Klämbt C, Hummel T, Granderath S, Schimmelpfeng K. 2001. Glial cell development in *Drosophila*. *Int J Dev Neurosci* **19**:373–378.
- Kleinman M.E, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi J.Z, Albuquerque R.J.C, Yamasaki S, Itaya M, Pan Y, Appukuttan B, Gibbs D, Yang Z, Kariko K, Ambati B.K, Wilgus T.A, Dipietro L.A, Sakurai E, Zhang K, Smith J.R, Taylor E.W, Ambati J. 2008. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3, *Nature* **452**: 591–597.
- Kleopa K. A. & Scherer, S. S. 2006. Molecular genetics of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* **8**: 107–122.
- Klugmann M, Schwab M.H, Puhlhofer A, Schneider A, Zimmermann F, Griffiths I.R, and Nave K.A. 1997. Assembly of CNS myelin in the absence of proteolipid protein. *Neuron*. **18**:59–70.
- Koenig HL, Schumacher M, Ferzaz B, DoThi AN, Ressoushes A, Guennoun R, Jung-Testas I, Robel P, Akwa Y, Baulieu E. 1995. Progesterone synthesis and myelin formation by Schwann Cells. *Science* **268**:1500–1503.
- Kohler R, Heyken WT, Heinau P, Schubert R, Si H, et al. 2006. Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**:1495–1502.
- Kubu CJ, Orimoto K, Morrison SJ, Weinmaster G, Anderson DJ, Verdi JM. 2002. Developmental changes in Notch1 and numb expression mediated by local cell-cell interactions underlie progressively increasing delta sensitivity in neural crest stem cells. *Dev Biol* **244**:199–214.
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Enderich J, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. 1998a. Cooperative function of POU proteins and SOX proteins in glial cells. *J Biol Chem* **273**:16050–16057.
- Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. 1998b. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci* **18**:237–250.
- Kwan HY, Huang Y, Yao X. 2007. TRP channels in endothelial function and dysfunction. *Biochim Biophys Acta* **1772**: 907–914
- Kwon J. M, Elliott J. L, Yee W. C, Ivanovich J, Scavarda N. J. & Moolsintong P. J. et al. 1995. Assignment of a second Charcot- Marie-Tooth type II locus to chromosome 3q. *Am J Hum Genet* **57**: 853–858.
- .

- Lawson V. H, Graham B. V. & Flanigan K. M. 2005. Clinical and electrophysiologic features of CMT2A with mutations in the mitofusin 2 gene. *Neurology* **65**: 197–204.
- Le N, Nagarajan R, Wang JY, Araki T, Schmidt RE, Milbrandt J. 2005a. Analysis of congenital hypomyelinating Egr2Lo/Lo nerves identifies Sox2 as an inhibitor of Schwann cell differentiation and myelination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:2596–2601.
- Le N, Nagarajan R, Wang JY, Svaren J, LaPash C, Araki T, Schmidt RE, Milbrandt J. 2005b. Nab proteins are essential for peripheral nervous system myelination. *Nat Neurosci* **8**: 932–940.
- LeBlanc SE, Ward RM, Svaren J. 2007. Neuropathy-associated Egr2 mutants disrupt cooperative activation of myelin protein zero by Egr2 and Sox10. *Mol Cell Biol* **27**:3521–3529.
- Lee MM, Badache A, DeVries GH. 1999. Phosphorylation of CREB in axon-induced Schwann cell proliferation. *J Neurosci Res* **55**:702–712
- Lee MM, Sato-Bigbee C, De Vries GH. 1996. Schwann cells stimulated by axolemma-enriched fractions express cyclic AMP responsive element binding protein. *J Neurosci Res* **46**:204–210.
- Leimeroth R, Lobsiger C, Lüssi A, Taylor V, Suter U, Sommer L. 2002. Membrane-bound neuregulin1 type III actively promotes Schwann cell differentiation of multipotent progenitor cells. *Dev Biol* **2**: 245-258
- Lemke G 2006. Neuregulin-1 and myelination. *Sci STKE* 325:pe11.
- Lemke G. 1992. Myelin and myelination: an introduction to molecular neurobiology. In: Hall ZW, editor. Sunderland, MA: Sinaur Associates, Inc. p 281–309.
- Lemke G, and R. Axel. 1985. Isolation and sequence of a cDNA encoding the major structural protein of peripheral myelin. *Cell*. **40**:501–508.
- Levine JD, Alessandri-Haber N. 2007. TRP channels: targets for the relief of pain. *Biochem Biophys Acta* **1772**: 989–1003
- Liedtke W, Tobin DM, Bargmann CI, Friedman JM. 2003. Mammalian TRPV4 (VR-OAC) directs behavioural responses to osmotic and mechanical stimuli in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 14531–14536.
- Lieuvin A, Labbé JC, Doré M, Job D. 1994. Intrinsic microtubule stability in interphase cells. *J Cell Biol* **124**: 985–996.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L, Hannon GJ. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**: 1437–1441
- Liu X, Bandyopadhyay B, Nakamoto T, Singh B, Liedtke W, et al. 2006. A role for AQP5 in activation of TRPV4 by hypotonicity: concerted involvement of AQP5 and TRPV4 in regulation of cell volume recovery. *J Biol Chem* **281**: 15485–15495

Lobsiger CS, Taylor V, Suter U. 2002. The early life of a Schwann cell. *Biol Chem* **383**:245–253.

Loeb JA, Khurana TS, Robbins JT, Yee AG, Fischbach GD. 1999. Expression patterns of transmembrane and released forms of neuregulin during spinal cord and neuromuscular synapse development. *Development* **126**:781–791.

Lönnqvist T. & Pihko H. 2003. Hereditary neuropathy with liability for pressure palsies (HNPP) in a toddler presenting with toe-walking and stiffness. *Neuromuscul Disord* **13**: 827–829.

Lopez-Bigas N, Olive M, Rabionet R, Ben-David O, Martinez-Matos J. A. & Bravo O. et al. 2001. Connexin 31 (GJB3) is expressed in the peripheral and auditory nerves and causes neuropathy and hearing impairment. *Hum Mol Genet* **10**: 947–952.

Lorenzo IM, Liedtke W, Sanderson MJ, Valverde MA. 2008. TRPV4 channel participates in receptor-operated calcium entry and ciliary beat frequency regulation in mouse airway epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 12611–12616

Luciano RL, Wilson AC. 2003. HCF-1 functions as a coactivator for the zinc finger protein Krox20. *J Biol Chem* **278**:51116–51124.

Lyons DA, Pogoda HM, Voas MG, Woods IG, Diamond B, Nix R, Arana N, Jacobs J, Talbot WS. 2005. Erbb3 and erbb2 are, essential for Schwann cell migration and myelination in zebrafish. *Curr Biol* **15**:513–524.

Ma YY, Huo HR, Li CH, Zhao BS, Li LF, et al. 2008. Effects of cinnamaldehyde on PGE2 release and TRPV4 expression in mouse cerebral microvascular endothelial cells induced by interleukin-1beta. *Biol Pharm Bull* **31**: 426–430.

Ma Z, Li J, He F, Wilson A, Pitt B, Li S. 2005. Cationic lipids enhance siRNA-mediated interferon response in mice. *Biochem Biophys Res Commun* **330**:755–759

Madrid RE, Jaros E, Cullen MJ, Bradley WG. 1975. Genetically determined defect of Schwann cell basement membrane in dystrophic mouse. *Nature* **257**:319–321.

Mager GM, Ward RM, Srinivasan R, Jang SW, Wrabetz L, Svaren J. 2008. Active gene repression by the Egr2-NAB complex during peripheral nerve myelination. *J Biol Chem* **283**:18187–18197.

Magyar J.P, Martini R, Ruelicke T, Aguzzi A, Adlkofer K, Dembic Z, Zielasek J, Toyka K.V, and U. Suter. 1996. Impaired differentiation of Schwann cells in transgenic mice with increased PMP22 gene dosage. *J. Neurosci.* **16**:5351–5360.

Mandemakers W, Zwart R, Jaegle M, Walbeehm E, Visser P, Grosveld F, Meijer D. 2000. A distal Schwann cell-specific enhancer mediates axonal regulation of the Oct-6 transcription factor during peripheral nerve development and regeneration. *EMBO J* **19**:2992–3003.

Manfioletti G, Ruaro ME, Del Sal G, Philipson L, Schneider C. 1990. A growth arrest-specific (gas) gene codes for a transmembrane protein. *Mol Cell Biol* **10**:2924–2930.

Mantei A, Rutz S, Janke M, Kirchhoff D, Jung U, Patzel V, Vogel U, Rudel T, Andreou I, Weber M, Scheffold A. 2008. siRNA stabilization prolongs gene knockdown in primary T lymphocytes, *Eur. J. Immunol.* **38**: 2616–2625.

Marchionni MA, Goodearl ADJ, Chen MS, Bermingham- McDonogh O, Kirk C, Hendricks M, Danehy F, Misumi D, Sudhalter J, Kobayashi K, Wroblewski D, Lynch C, Baldassare M, Hiles I, Davis JB, Hsuan JJ, Tooty NF, Otsu M, McBurney RN, Waterfield MD, Stroobant P, Gwynne D. 1993. Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system. *Nature* **362**:312–318

Maro GS, Vermeren M, Voiculescu O, Melton L, Cohen J, Charnay P, Topilko P. 2004. Neural crest boundary cap cells constitute a source of neuronal and glial cells of the PNS. *Nat Neurosci* **7**:930–938.

Martin JR, Webster HD. 1973. Mitotic Schwann cells in developing nerve: Their changes in shape, fine structure, and axon relationships. *Dev Biol* **32**:417–431.

Martini R, Schachner M. 1997. Molecular basis of myelin formation as revealed by investigations on mice deficient in glial cell surface molecules. *Glia* **19**:298–310.

Marvin KW, Fujimoto W, Jetten AM. 1995. Identification and characterization of a novel squamous cell-associated gene related to PMP22. *J Biol Chem* **48**:28910–28916.

Mastaglia F. L, Nowak K. J, Stell R, Phillips B. A, Edmondson J. E. & Dorosz S. M. et al. 1999 Novel mutation in the myelin protein zero gene in a family with intermediate hereditary motor and sensory neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **67**: 174– 179.

Matsui Y, Kobayashi N, Nishikawa M, Takakura Y. 2005. Sequence-specific suppression of mdrla/1b expression in mice via RNA interference, *Pharm. Res.* **22**: 2091–2098.

Mcbride JL , Boudreau RL, Harper SQ, Staber PD, Monteys AM, Martins I, Gilmore BL, Burstein H, Peluso RW, Polisky B, Carter BJ, Davidson BL. 2008. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 5868–5873.

McNiven MA. 1998. Dynamin: a molecular motor with pinchase action. *Cell* **94**, 151–154.

Mechta-Grigoriou F, Gerald D, Yaniv M (2001). The mammalian Jun proteins: redundancy and specificity. *Oncogene* **20**:2378–2389.

Medicinska naklada. Gao X, Daugherty RL, Tourtellotte WG. 2007. Regulation of low affinity neurotrophin receptor (p75(NTR)) by early growth response (Egr) transcriptional regulators. *Mol Cell Neurosci* **36**:501–514

Meeson AP, Shi X, Alexander MS, Williams RS, Allen RE, Jiang N, Adham IM, Goetsch SC, Hammer RE, Garry DJ. 2007. Sox15 and Fhl3 transcriptionally coactivate Foxk1 and regulate myogenic progenitor cells. *EMBO J.* **26**: 1902–1912.

- Mersiyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, Sitnikov VF, Dadali EL. & Oparin, RB. et al. 2000. A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet* **67**: 37–46.
- Meyer D, Birchmeier C (1995). Multiple essential functions of neuregulin in development. *Nature* **378**: 386–390.
- Meyer D, Yamaai T, Garratt A, Riethmacher-Sonnenberg E, Kane D, Theill LE, Birchmeier C 1997. Isoform-specific expression and function of neuregulin. *Development* **124**: 3575–3586.
- Meyer zu Hörste G, Prukop T, Nave KA, Sereda MW. 2006. Myelin disorders: causes and perspectives of Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *J Mol Neurosci* **28**: 77–88.
- Michailov GV, Sereda MW, Brinkmann BG, Fischer TM, Haug B, Birchmeier C, Role L, Lai C, Schwab MH, Nave KA. 2004. Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness. *Science* **304**:700–703.
- Mikuma T, Kawasaki H, Yamamoto Y, Taira K. 2004. Overexpression of Dicer enhances RNAi-mediated gene silencing by short-hairpin RNAs (shRNAs) in human cells, *Nucleic Acids Symp. Ser.* 191–192.
- Miner JH, Yurchenco PD. 2004. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**:255–284
- Mirsky R, Woodhoo A, Parkinson D. B, Arthur-Farraj P, Bhaskaran A, Jessen K. R. 2008. Novel signals controlling embryonic Schwann cell development, myelination and dedifferentiation. *Journal of the peripheral nervous system* **13**: 122- 135.
- Mirsky R, Jessen K.R, Brennan A, Parkinson D, Dong Z, Meier C, Parmantier E, and Lawson D. 2002. Schwann cells as regulators of nerve development. *J. Physiol. Paris* **96**: 17–24.
- Mizuno A, Matsumoto N, Imai M, Suzuki M. 2003. Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4. *Am J Physiol Cell Physiol* **285**: C96–101.
- Monuki ES, Kuhn R, Lemke G. 1993. Repression of the myelin P0 gene by the POU transcription factor SCIP. *Mech Dev* **42**:15–32.
- Monuki ES, Kuhn R, Weinmaster G, Trapp BD, Lemke G. 1990. Expression and activity of the POU transcription factor SCIP. *Science* **249**:1300–1303.
- Monuki ES, Weinmaster G, Kuhn R, Lemke G. 1989. SCIP: A glial POU domain gene regulated by cyclic AMP. *Neuron* **3**: 783–793.
- Morgan L, Jessen KR, Mirsky R. 1991. The effects of cAMP on differentiation of cultured Schwann cells: Progression from an early phenotype (041) to a myelin phenotype (P01, GFAP-, N-CAM-, NGF-receptor-) depends on growth inhibition. *J Cell Biol* **112**:457–467.
- Morris JK, Lin W, Hauser C, Marchuk Y, Getman D, Lee KF. 1999. Rescue of the cardiac defect in ErbB2 mutant mice reveals essential roles of ErbB2 in peripheral nervous system development. *Neuron* **23**: 273–283.

- Morrison SJ, Perez SE, Qiao Z, Verdi JM, Hicks C, Weinmaster G, Anderson DJ. 2000. Transient Notch activation initiates an irreversible switch from neurogenesis to gliogenesis by neural crest stem cells. *Cell* **101**: 499–510.
- Morrison SJ, White PM, Zock C, Anderson DJ. 1999. Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells. *Cell* **96**: 737–749.
- Nagarajan R, Le N, Mahoney H, Araki T, Milbrandt J. 2002. Deciphering peripheral nerve myelination by using Schwann cell expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 8998–9003.
- Nagarajan R, Svaren J, Le N, Araki T, Watson M, Milbrandt J. 2001. EGR2 mutations in inherited neuropathies dominantnegatively inhibit myelin gene expression. *Neuron* **30**: 355–368.
- Nakagawa M, Miyagoe-Suzuki Y, Ikezoe K, Miyata Y, Nonaka I, Harii K, Takeda S. 2001. Schwann cell myelination occurred without basal lamina formation in laminin alpha2 chain-null mutant (dy3K/dy3K) mice. *Glia* **35**:101–110
- Nave KA, Salzer JL. 2006. Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Curr Opin Neurobiol* **16**: 492–500.
- Nave KA, Trapp BD. 2008. Axon-glial signaling and the glial support of axon function. *Annu Rev Neurosci* **31**: 535–561.
- Nave K.A, and O. Boespflug-Tanguy. 1996. X-linked developmental defects of myelination: from mouse mutants to human genetic diseases. *Neuroscientist*. **2**: 33–43.
- Nelis E, Berciano J, Verpoorten N, Coen K, Dierick I. & Van Gerwen V. 2004. Autosomal dominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease type 2 (CMT2G) maps to chromosome 12q12–q13.3. *J Med Genet* **41**: 193–197.
- Nelis E, Haites N. & Van Broeckhoven C. 1999. Mutations in the peripheral myelin genes and associated genes in inherited peripheral neuropathies. *Hum Mutat* **13**: 11–28.
- Nickols JC, Valentine W, Kanwal S, Carter BD. 2003. Activation of the transcription factor NF-kappaB in Schwann cells is required for peripheral myelin formation. *Nat Neurosci* **6**: 161–167.
- Niemann A, Berger P. & Suter U. 2006. Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular* **8**: 217-242
- Nikam SS, Tennekoon GI, Christy BA, Yoshino JE, Rutkowski JL. 1995. The zinc finger transcription factor Zif268/Egr-1 is essential for Schwann cell expression of the p75 NGF receptor. *Mol Cell Neurosci* **6**:337–348.
- Noakes PG, Gautam M, Mudd J, Sanes JR, Merlie JP. 1995. Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/ laminin beta 2. *Nature* **374**: 258–262.

- Nodari A, Zambroni D, Quattrini A, Court FA, D'Urso A, Recchia A, Tybulewicz VL, Wrabetz L, Feltri ML. 2007. Beta1 integrin activates Rac1 in Schwann cells to generate radial lamellae
- Norton, W.T., and S.E. Poduslo. 1973. Myelination in rat brain: changes in myelin composition during brain maturation. *J. Neurochem.* **21**: 759–773.
- Quattrini A, Previtali S, Feltri M.L, Canal N, Nemni R, and Wrabetz L. 1996. Beta 4 integrin and other Schwann cell markers in axonal neuropathy. *Glia.* **17**: 294–306.
- Notterpek L, Shooter EM, Snipes GJ. 1997. Upregulation of the endosomal-lysosomal pathway in the trembler-J neuropathy. *J Neurosci* **17**: 4190–4200.
- Nykanen A, Haley B, Zamore PD. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* **107**: 309–321
- Obremski VJ, Hall AM, Fernandez-Valle C. 1998. Merlin, the neurofibromatosis type 2 gene product, and beta1 integrin associate in isolated and differentiating Schwann cells. *J Neurobiol* **37**: 487–501.
- Pan Z, Yang H, Mergler S, Liu H, Tachado SD, et al. 2008. Dependence of regulatory volume decrease on transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) expression in human corneal epithelial cells. *Cell Calcium* **44**: 374–385.
- Panas M, Kalfakis N, Karadimas C. & Vassilopoulos D. et al. 2001. Episodes of generalized weakness in two sibs with the C164T mutation of the connexin 32 gene. *Neurology* **57**: 1906–1908.
- Pareek S, Notterpek L, Snipes GJ, Naef R, Sossin W, Laliberte J, Iacampo S, Suter U, Shooter EM, Murphy RA. 1997. Neurons promote the translocation of peripheral myelin protein 22 into myelin. *J Neurosci* **17**: 7754–7762.
- Pareek S, Suter U, Snipes GJ, Welcher AA, Shooter EM, Murphy RA. 1993. Detection and processing of peripheral myelin protein PMP22 in cultured Schwann cells. *J Biol Chem* **268**: 10372–10379.
- Pareyson D, Taroni F, Botti S, Morbin M, Baratta S. & Lauria G. et al. 2000. Cranial nerve involvement in MCT disease type I due to early growth response 2 gene mutation. *Neurology* **54**: 1696–1698.
- Pareyson D, Scaiola V. & Laura M. 2006. Clinical and electrophysiological aspects of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* **8**: 1559–1574.
- Parkinson DB, Bhaskaran A, Arthur-Farraj P, Noon L, Woodhoo A, Lloyd AC, Feltri ML, Wrabetz L, Behrens A, Mirsky R, Jessen KR. 2008. c-Jun is a negative regulator of myelination. *J Cell Biol* **181**: 625–637.
- Parkinson DB, Bhaskaran A, Droggiti A, Dickinson S, D'Antonio M, Mirsky R, Jessen KR. 2004. Krox-20 inhibits Jun-NH2-terminal kinase/c-Jun to control Schwann cell proliferation and death. *J Cell Biol* **164**: 385–394.

Parkinson DB, Dickinson S, Bhaskaran A, Kinsella MT, Brophy PJ, Sherman DL, Sharghi-Namini S, Duran Alonso MB, Mirsky R, Jessen KR. 2003. Regulation of the myelin gene periaxin provides evidence for Krox-20-independent myelin-related signalling in Schwann cells. *Mol Cell Neurosci* **23**: 13–27.

Parkinson DB, Dong Z, Bunting H, Whitfield J, Meier C, Marie H, Mirsky R, Jessen KR. 2001. Transforming growth factor β (TGF β) mediates Schwann cell death in vitro and in vivo: examination of c-Jun activation, interactions with survival signals, and the relationship of TGF β mediated death to Schwann cell differentiation. *J Neurosci* **21**: 8572–8585

Patton BL, Chiu AY, Sanes JR. 1998. Synaptic laminin prevents glial entry into the synaptic cleft. *Nature* **393**: 698–701.

Patton BL, Cunningham JM, Thyboll J, Kortessmaa J, Westerblad H, Edstrom L, Tryggvason K, Sanes JR. 2001. Properly formed but improperly localized synaptic specializations in the absence of laminin alpha4. *Nat Neurosci* **4**: 597–604.

Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes JR. 1997. Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J Cell Biol* **139**: 507–1521

Paulson H. L., Garbern J. Y., Hoban T. F., Krajewski K. M., Lewis R. A. & Fischbeck K. H. et al. 2002. Transient central nervous system white matter abnormality in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease. *Ann Neurol* **52**: 429–434.

Peirano RI, Goerich DE, Riethmacher D, Wegner M. 2000. Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10. *Mol Cell Biol* **20**: 3198–3209.

Peirano RI, Wegner M. 2000. The glial transcription factor Sox10 binds to DNA both as monomer and dimer with different functional consequences. *Nucleic Acids Res* **28**:3047–3055.
Pennuto M, Tinelli E, Malaguti M, Del Carro U, D'Antonio M, Ron D, Quattrini A, Feltri ML, Wrabetz L. 2008. Ablation of the UPR-mediator CHOP restores motor function and reduces demyelination in Charcot-Marie-Tooth 1B mice. *Neuron* **57**: 393–405.

Pertusa M, Morenilla-Palao C, Carteron C, Viana F, Cabedo H. 2007. Transcriptional control of cholesterol biosynthesis in Schwann cells by axonal neuregulin 1. *J Biol Chem* **282**: 28768–28778.

Pirollo KF, Zon G, Rait A, Zhou Q, Yu W, Hogrefe R, Chang EH. 2006. Tumor-targeting nanoimmunoliposome complex for short interfering RNA delivery. *Hum Gene Ther* **17**: 117–124

Podratz JL, Rodriguez E, Windebank AJ 2001. Role of the extracellular matrix in myelination of peripheral nerve. *Glia* **35**: 35–40.

Podratz JL, Rodriguez EH, DiNonno ES, Windebank AJ. 1998. Myelination by Schwann cells in the absence of extracellular matrix assembly. *Glia* **23**: 383–388.

Podratz JL, Rodriguez EH, Windebank AJ. 2004. Antioxidants are necessary for myelination of dorsal root ganglion neurons, in vitro. *Glia* **45**: 54–58.

Popko B. 2003. Notch signaling: a rheostat regulating oligodendrocyte differentiation? *Dev Cell* **5**: 668–689.

Previtali SC, Feltri ML, Archelos JJ, Quattrini A, Wrabetz L, Hartung H. 2001. Role of integrins in the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* **64**: 35–49.

Previtali SC, Nodari A, Taveggia C, Pardini C, Dina G, Villa A, Wrabetz L, Quattrini A, Feltri ML. 2003. Expression of laminin receptors in Schwann cell differentiation: Evidence for distinct roles. *J Neurosci* **23**: 5520–5530.

Pu P, Zhang Z, Kang C, Jiang R, Jia Z, Wang G, Jiang H. 2009. Downregulation of Wnt2 and β -catenin by siRNA suppresses malignant glioma cell growth, *Cancer Gene Ther* **16**: 351–361

Raeymaekers P, Timmerman V, De Jonghe P, Swerts L, Gheuens J. & Martin J. J. et al. 1989. Localization of the mutation in an extended family with Charcot-Marie-Tooth neuropathy (HMSN I). *Am J Hum Genet* **45**: 953–958.

Raivich G, and Behrens A. 2006 . Role of the AP-1 transcription factor c-Jun in developing, adult and injured brain. *Prog. Neurobiol.* **78**: 347 – 363

Rand TA, Ginalski K, Grishin NV, Wang X. 2004. Biochemical identification of Argonaute 2 as the sole protein required for RNA-induced silencing complex activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**:14385–14389

Rasminsky M, Kearney RE, Aguayo AJ, Bray GM. 1978. Conduction of nervous impulses in spinal roots and peripheral nerves of dystrophic mice. *Brain Res* **143**:71–85.

Readhead C, Schneider A, Griffiths I, and Nave K.A. 1994. Premature arrest of myelin formation in transgenic mice with increased proteolipid protein gene dosage. *Neuron*. **12**:583–595.

Reilly M. M. 2007. Sorting out the inherited neuropathies. *Pract Neurol* **7**: 93–105.

Relvas JB, Setzu A, Baron W, Buttery PC, LaFlamme SE, Franklin RJ, ffrench-Constant C. 2001. Expression of dominant-negative and chimeric subunits reveals an essential role for β 1 integrin during myelination. *Curr Biol* **11**:1039–1043

Riethmacher D, Sonnenberg-Riethmacher E, Brinkmann V, Yamaai T, Lewin GR, Birchmeier C 1997. Severe neuropathies in mice with targeted mutations in the ErbB3 receptor. *Nature* **389**: 725–730.

Rigoard P, Lapierre F 2009. Rappels sur le nerf périphérique. *Neurochirurgie* **55** : 360- 374

Rivas FV, Tolia NH, Song JJ, Aragon JP, Liu J, Hannon GJ, Joshua-Tor L. 2005. Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol* **12**: 340–349

Rizvi TA, Huang Y, Sidani A, Atit R, Largaespada DA, Boissy RE, Ratner N. 2002. A novel cytokine pathway suppresses glial cell melanogenesis after injury to adult nerve. *J Neurosci* **22**: 9831–9840.

- Roa B. B, Dyck P. J, Marks H. G, Chance P. F. & Lupski J. R. 1993. Dejerine-Sottas syndrome associated with point mutation in the peripheral myelin protein 22 (PMP22) gene. *Nat Genet* **5**: 269–273.
- Robbins M, Judge A, Ambegia E, Choi C, Yaworski E, Palmer L, Mcclintock K, Maclachlan I. 2008. Misinterpreting the therapeutic effects of small interfering RNA caused by immune stimulation, *Hum. Gene Ther.* **19**: 991–999.
- Rock MJ, Prenen J, Funari VA, Funari TL, Merriman B, et al. 2008. Gain-of-function mutations in TRPV4 cause autosomal dominant brachyolmia. *Nat Genet* **40**: 999–1003.
- Russo MW, Severson BR, Milbrandt J. 1995. Identification of NAB1, a repressor of NGFI-A- and Krox20-mediated transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 6873–6877.
- Ryu EJ, Wang JY, Le N, Baloh RH, Gustin JA, Schmidt RE, Milbrandt J. 2007. Misexpression of Pou3f1 results in peripheral nerve hypomyelination and axonal loss. *J Neurosci* **27**:11552–11559.
- Sagane K, Hayakawa K, Kai J, Hirohashi T, Takahashi E, Miyamoto N, Ino M, Oki T, Yamazaki K, Nagasu T 2005. Ataxia and peripheral nerve hypomyelination in ADAM22-deficient mice. *BMC Neurosci* **6**:33.
- Saher G, Quintes S, Möbius W, Wehr MC, Kraemer-Albers EM, Brügger B, Nave KA 2009. Cholesterol regulates the endoplasmic reticulum exit of the major membrane protein P0 required for peripheral myelin compaction. *J Neurosci* **29**:6094–6104.
- Saifi G. M, Szigeti K, Wiszniewski W, Shy M. E, Krajewski K. & Hausmanowa-Petrusewicz I. et al. 2005. SIMPLE mutations in Charcot-Marie-Tooth disease and the potential role of its protein product in protein degradation. *Hum Mutat* **25**: 372–383.
- Saito F, Moore SA, Barresi R, Henry MD, Messing A, Ross-Barta SE, Cohn RD, Williamson RA, Sluka KA, Sherman DL, et al. 2003. Unique role of dystroglycan in peripheral nerve myelination, nodal structure, and sodium channel stabilization. *Neuron* **38**: 747–758
- Sanes JR, Lichtman JW. 2001. Induction, assembly, maturation and maintenance of a postsynaptic apparatus. *Nat Rev Neurosci* **2**:791– 805.
- Schachner M, Martini R. 1995. Glycans and the modulation of neuronal-recognition molecule function. *Trends Neurosci* **18**:183– 191
- Schelhaas H. J, Van Engelen B. G, Gabreels-Festen A. A, Hageman G, Vliegen J. H. & Van Der Knapp M. S. et al. 2002. Transient cerebral white matter lesions in a patient with connexin 32 missense mutation. *Neurology* **59**: 2007–2008.
- Scherer SS, Salzer JL 2001. Axon-Schwann cell interactions during peripheral nerve degeneration and regeneration. In: Glial Cell Development: Basic Principles and Clinical Relevance, 2nd Edn. Jessen KR, Richardson WD (Eds). *Oxford University Press*, Oxford, pp 299–330.

- Scherer S.S, Braun P.E, J. Grinspan E. Collarini D.Y. Wang and J. Kamholz. 1994. Differential regulation of the 29, 39-cyclic nucleotide 39-phosphodiesterase gene during oligodendrocyte development. *Neuron*. **12**: 1363– 1375.
- Schlierf B, Ludwig A, Klenovsek K, Wegner M. 2002. Cooperative binding of Sox10 to DNA: Requirements and consequences. *Nucleic Acids Res* **30**: 5509–5516.
- Schneider-Schaulies J, A. von Brunn and M. Schachner. 1990. Recombinant peripheral myelin protein P0 confers both adhesion and neurite outgrowthpromoting properties. *J. Neurosci. Res.* **27**:286–297.
- Schreiner S, Cossais F, Fischer K, Scholz S, Bosl MR, Holtmann B, Sendtner M, Wegner M 2007. Hypomorphic Sox10 alleles reveal novel protein functions and unravel development **134**: 3271-3281
- Schröder J. M. 2001. Pathology of Peripheral Nerves. An Atlas of Structural and Molecular Pathological Changes. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. Scott, K. R. & Kothari, M. J. 2005 hereditary neuropathies. *Semin Neurol* **25**: 174–184.
- Schwartz MA. 2001. Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* **11**:466–470.
- Sereda M, Griffiths I, Puhlhofer A, Stewart H, Rossner MJ, Zimmermann F, Magyar JP, Schneider A, Hund E, Meinck HM, et al. 1996. A transgenic rat model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuron*. **16**: 1049– 1060.
- Sevetson BR, Svaren J, Milbrandt J. 2000. A novel activation function for NAB proteins in EGR-dependent transcription of the luteinizing hormone beta gene. *J Biol Chem* **275**: 9749–9757.
- Shaibani A, Gooch C. & Harati Y. 1997. Moving toes and myoclonus associated with hereditary neuropathy with liability to pressure palsy (HNPP). *Muscle Nerve* **20**: 881–883.
- Shen L, Evel-Kabler K, Strube R, Chen SY. 2004 Silencing of SOCS1 enhances antigen presentation by dendritic cells and antigen-specific anti-tumor immunity. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1546–1553.
- Shen-Orr SS, Milo R, Mangan S, Alon U. 2002. Network motifs in the transcriptional regulation network of Escherichia coli. *Nat Genet* **31**: 64–68.
- Shorer Z, Philpot J, Muntoni F, Sewry C, Dubowitz V. 1995. Demyelinating peripheral neuropathy in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *J Child Neurol* **10**: 472–475.
- Shy ME, Shi Y, Wrabetz L, Kamholz J, Scherer SS 1996. Axon- Schwann cell interactions regulate the expression of c-jun in Schwann cells. *J Neurosci Res* **43**: 511–525.
- Shy ME, Lupski JR, Chance PF, Klein C. J. & Dyck P. J. 2005. Hereditary Motor and Sensory Neuropathies: an overview of clinical, genetic, electrophysiologic, and pathologic features. in: *Peripheral neuropathy* 4th ed. (eds. P. J. Dyck & P. K. Thomas), pp 1623–1658.

- Sim FJ, Zhao C, Li WW, Lakatos A, Franklin RJ. 2002. Expression of the POU-domain transcription factors SCIP/Oct-6 and Brn-2 is associated with Schwann cell but not oligodendrocyte remyelination of the CNS. *Mol Cell Neurosci* **20**: 669–682.
- Sioud M. 2005. Induction of inflammatory cytokines and interferon responses by double-stranded and single-stranded siRNAs is sequence-dependent and requires endosomal localization. *J Mol Biol* **348**: 1079–1090
- Sioud M, Sorensen DR. 2003. Cationic liposome-mediated delivery of siRNAs in adult mice. *Biochem Biophys Res Commun* **312**: 1220–1225
- Sivakumar K, Kyriakides T, Puls I, Nicholson G. A, Funalot B, Antonellis A. et al. 2005 phenotypic spectrum of disorders associated with glycyl-tRNA synthetase mutations. *Brain* **128** (Pt 10): 2304–2314.
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR 2003. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol* **5**: 834–839
- Snipes GJ, Suter U, Shooter EM. 1993. Human peripheral myelin protein-22 carries the L-2/HNK-1 carbohydrate adhesion epitope. *J Neurochem* **61**: 1961–1964.
- Snipes GJ, Suter U, Welcher AA, Shooter EM. 1992. Characterization of a novel peripheral nervous system myelin protein (PMP-22/ SR13). *J Cell Biol* **117**: 225–238.
- Snipes GJ, Suter U. 1995a. Molecular anatomy and genetics of myelin proteins in the peripheral nervous system. *J Anat* **186**: 483–494.
- Snipes GJ, Suter U. 1995b. Molecular basis of common hereditary motor and sensory neuropathies in humans and in mouse models. *Brain Pathol.* **5**: 233–247.
- Sobue G, Shuman S, Pleasure D. 1986. Schwann cell responses to cyclic AMP: Proliferation, change in shape, and appearance of surface galactocerebroside. *Brain Res* **362**: 23–32.
- Sock E, Rettig S.D, Enderich J, Bosl M.R, Tamm E.R, Wegner M, 2004. Gene targeting reveals a widespread role for the high-mobility-group transcription factor Sox11 in tissue remodeling. *Mol. Cell. Biol.* **24**: 6635–6644.
- Spies B, Hochrein H, Vabulas M, Huster K, Busch D.H, Schmitz F, Heit A, Wagner H. 2003. Vaccination with plasmid DNA activates dendritic cells via toll-like receptor 9 (TLR9) but functions in TLR9-deficient mice, *J. Immunol.* **171**: 5908–5912.
- Srinivasan R, Jang SW, Ward RM, Sachdev S, Ezashi T, Svaren J. 2007. Differential regulation of NAB corepressor genes in Schwann cells. *BMC Mol Biol* **8**: 117.
- Srinivasan R, Mager GM, Ward RM, Mayer J, Svaren J. 2006. NAB2 represses transcription by interacting with the CHD4 subunit of the nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex. *J Biol Chem* **281**: 15129–15137.
- Stahl N, Harry J, and Popko B. 1990. Quantitative analysis of myelin protein gene expression during development in the rat sciatic nerve. *Mol. Brain. Res.* **8**: 209–212.

Stewart HJS 1995. Expression of c-Jun, Jun B, Jun D and cAMP response element binding protein by Schwann cells and their precursors in vivo and in vitro. *Eur J Neurosci* **7**:1366–1375

Stewart HJS, Morgan L, Jessen KR, Mirsky R. 1993. Changes in DNA synthesis rate in the Schwann cell lineage in vivo are correlated with the precursor-Schwann cell transition and Stirling CA. 1975. Abnormalities in Schwann cell sheaths in spinal nerve roots of dystrophic mice. *J Anat* **119**: 169–180.

Stolt CC, Lommes P, Friedrich RP, Wegner M. 2004. Transcription factors Sox8 and Sox10 perform non-equivalent roles during oligodendrocyte development despite functional redundancy. *Development* **131**:2349–2358.

Street VA, Bennet CL. & Golden, JD. 2003. Mutation of a putative protein degradation gene LITAF/SIMPLE in Charcot- Marie-Tooth disease 1C. *Neurology* **60**: 22–26.

Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD. 2000. OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol* **2**: 695–702.

Sunada Y, Bernier SM, Utani A, Yamada Y, Campbell KP. 1995. Identification of a novel mutant transcript of laminin alpha 2 chain gene responsible for muscular dystrophy and dysmyelination in dy2J mice. *Hum Mol Genet* **4**:1055–1061

Suter U, Moskow JJ, Welcher AA, Snipes GJ, Kosaras B, Sidman RL, Buchberg AM, Shooter EM. 1992b. A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kD peripheral myelin protein in the trembler-J mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 4382–4386.

Suter U, Welcher AA, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, Billings-Gagliardi S, Sidman RL, Shooter EM. 1992a. Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature* **356**: 241– 244.

Svaren J, Sevetson BR, Apel ED, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J. 1996. NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol* **16**: 3545–3553.

Svaren J, Sevetson BR, Golda T, Stanton JJ, Swirnoff AH, Milbrandt J. 1998. Novel mutants of NAB corepressors enhance activation by Egr transactivators. *EMBO J* **17**:6010–6019.
Swiers G, Patient R, Loose M. 2006. Genetic regulatory networks programming hematopoietic stem cells and erythroid lineage specification. *Dev Biol* **294**: 525–540.

Swirnoff AH, Apel ED, Svaren J, Sevetson BR, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J. 1998. Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol Cell Biol* **18**: 512–524.

Tabernero A, Stewart HJS, Jessen KR, Mirsky R. 1998. The Neuron- Glia Signal beta Neuregulin Induces Sustained CREB Phosphorylation on Ser-133 in Cultured Rat Schwann Cells. *Mol Cell Neurosciences* **10**: 309–322.

Tabuchi K, Suzuki M, Mizuno A, Hara A. 2005. Hearing impairment in TRPV4 knockout mice. *Neurosci Lett* **382**: 304–308.

Takahashi Y, Nishikawa M, Suehara T, Takiguchi N, Takakura Y. 2008. Gene silencing of β -catenin in melanoma cells retards their growth but promotes the formation of pulmonary metastasis in mice, *Int. J. Cancer* **123**: 2315–2320.

Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. 2009. Nonviral vector-mediated RNA interference: Its gene silencing characteristics and important factors to achieve RNAi-based gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* **61**: 760–766

Takahashi Y, Nishikawa M, Takakura Y. 2006. Suppression of tumor growth by intratumoral injection of short hairpin RNA-expressing plasmid DNA targeting β -catenin or hypoxia-inducible factor 1 α . *J. Control Release* **116**: 90–95.

Tanigaki K, Nogaki F, Takahashi J, Tashiro K, Kurooka H, Honjo T. 2001. Notch1 and Notch3 instructively restrict bFGF responsive multipotent neural progenitor cells to an astroglial fate. *Neuron* **29**: 45–55.

Taveggia C, Zanazzi G, Petrylak A, Yano H, Rosenbluth J, Einheber S, Xu X, Esper RM, Loeb JA, Shrager P, Chao MV, Falls DL, Role L, Salzer JL. 2005. Neuregulin-1 type III determines the ensheathment fate of axons. *Neuron* **47**: 681–694.

Taylor V, Welcher AA, Amgen EST Program, and Suter U. 1995. Epithelial membrane protein-1, peripheral myelin protein 22, and lens membrane protein 20 define a novel gene family. *J Biol Chem* **270**: 28824–28833.

Taylor RA, Simon EM, Marks HG. & Scherer SS. 2003. The CNS phenotype of X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: more than a peripheral problem. *Neurology* **61**: 1475–1478.

Teilmann SC, Byskov AG, Pedersen PA, Wheatley DN, Pazour GJ, et al. 2005. Localization of transient receptor potential ion channels in primary and motile cilia of the female murine reproductive organs. *Mol Reprod Dev* **71**: 444–452.

Timpl R. 1996. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol* **8**: 618–624

Topilko P, Levi G, Merlo G, Mantero S, Desmarquet C, Mancardi G, Charnay P. 1997. Differential regulation of the zinc finger genes Krox-20 and Krox-24 (Egr-1) suggests antagonistic roles in Schwann cells. *J Neurosci Res* **50**: 702–712.

Topilko P, Meijer D. 2001. Transcription factors that control Schwann cell development and myelination. In: *Glial Cell Development: Basic Principles and Clinical Relevance*, 2nd Edn. Jessen KR, Richardson WD (Eds). Oxford University Press, Oxford, pp 223–244.

Topilko P, Schneider-Manoury S, Levi G, Baron-Van Evercooren A, Chennoufi ABY, Seitanidou T, Babinet C, Charnay P. 1994. Krox-20 controls myelination in the peripheral nervous system. *Nature* **371**: 796–799.

Topilko P, Schneider-Maunoury S, Levi G, Trembleau A, Gourdji D, Driancourt MA, Rao CV, Charnay P. 1998. Multiple pituitary and ovarian defects in Krox-24 (NGFI-A, Egr-1)-targeted mice. *Mol Endocrinol* **12**: 107–122.

Trapp B.D, Kidd GJ, Hauer P, Mulrenin E, Haney CA and Andrews SB. 1995. Polarization of myelinating Schwann cell surface membranes: role of microtubules and the trans-Golgi network. *J. Neurosci.* **15**: 1797–1807.

Trapp BD, Moench T, Pulley M, Barbosa E, Tennekoon G, and Griffin J. 1987. Spatial segregation of mRNA encoding myelin-specific proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**: 7773–7777

Ueyama, T. 1978. The topography of root fibres within the sciatic nerve trunk of the dog. *J. Anat.* **127**: 277–290.

Uusitalo H, Salminen H, Vuorio E. 2001. Activation of chondrogenesis in response to injury in normal and transgenic mice with cartilage collagen mutations. *Osteoarthr. Cartil.* **9** (Suppl A), S174–S179

Valentijn LJ, Baas F, Wolterman RA, Hoogendijk JE, Van Den Bosch NH. & Zorn I. et al. 1992. Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Nat Genet* **2**: 288–291.

Vallat JM, Sindou P, Preux PM, Tabaraud F, Milor AM, Couratier P, LeGuern E and Brice A. 1996. Ultrastructural PMP22 expression in inherited demyelinating neuropathies. *Ann. Neurol.* **39**: 813–817.

Vance JM, Nicholson GA, Yamaoka LH, Stajich J, Stewart CS & Speer MC. et al. 1989. Linkage of Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a to chromosome 17. *Exp Neurol* **104**: 186–189.

Vartanian T, Goodearl A, Lefebvre S, Park SK, Fischbach G. 2000. Neuregulin induces the rapid association of focal adhesion kinase with the erbB2–erbB3 receptor complex in schwann cells. *Biochem Biophys Res Commun* **271**: 414–417.

Verheijen MH, Chrast R, Burrola P, Lemke G. 2003. Local regulation of fat metabolism. *Genes Dev* **17**: 2450–2464.

Verhoeven K, Claeys K G, Zuchner S, Schroder JM, Weis J & Ceuterick C. et al. 2006. MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* **129** (Pt 8), 2093–2102.

Verhoeven K, De Jonghe P, Coen K, Verpoorten N, Auer-Grumbach M & Kwon JM. et al. 2003a. Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot- Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet* **72**: 722– 727.

Verma UN, Surabhi RM, Schmaltieg A, Becerra C, Gaynor RB. 2003. Small interfering RNAs directed against β -catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells, *Clin. Cancer Res.* **9**: 1291–1300.

- Wakamatsu Y, Maynard TM, Weston JA 2000. Fate determination of neural crest cells by NOTCH-mediated lateral inhibition and asymmetrical cell division during gangliogenesis. *Development* **127**: 2811-2821
- Wang JY, Miller SJ, Falls DL. 2001. The N-terminal region of neuregulin isoforms determines the accumulation of cell surface and released neuregulin ectodomain. *J Biol Chem* **276**: 2841–2851.
- Wang S, Sdrulla AD, diSibio G, Bush G, Nofziger D, Hicks C, Weinmaster G, Barres BA (1998). Notch receptor activation inhibits oligodendrocyte differentiation. *Neuron* **21**: 63–75.
- Waning J, Vriens J, Owsianik G, Stuwe L, Mally S, et al. (2007) A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration. *Cell Calcium* **42**: 17–25
- Wanner IB, Guerra NK, Mahoney J, Kumar A, Wood PM, Mirsky R, Jessen KR 2006b. Role of N-cadherin in Schwann cell precursors of growing nerves. *Glia* **54**: 439–459.
- Wanner IB, Mahoney J, Jessen KR, Wood PM, Bates M, Bunge MB. 2006a. Invariant mantling of growth cones by Schwann cell precursors characterize growing peripheral nerve fronts. *Glia* **54**:424–438.
- Warner LE, Garcia CA, Lupski JR. 1999a. Hereditary peripheral neuropathies: clinical forms, genetics, and molecular mechanisms. *Annu Rev Med* **50**: 263–275.
- Warner LE, Mancias P, Butler IJ, McDonald CM, Keppen L, Koob KG, Lupski JR. 1998. Mutations in the early growth response 2 (EGR2) gene are associated with hereditary myelinopathies. *Nat Genet* **18**: 382–384.
- Watanabe H, Davis JB, Smart D, Jerman JC, Smith GD, et al. 2002. Activation of TRPV4 channels (hVRL-2/mTRP12) by phorbol derivatives. *J Biol Chem* **277**: 13569–13577
- Webster HD, Martin R, O’Connell MF. 1973. The relationships between interphase Schwann cells and axons before myelination: A quantitative electron microscopic study. *Dev Biol* **32**: 401–416.
- Webster Hd. 1993. Development of peripheral nerve fibers. In Peripheral neuropathy (eds. P.J. Dyck, P.K. Thomas, J.W. Griffin, P.A. Low, and J.F. Poduslo), pp. 243–266. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Wegner M, Stolt CC. 2005. From stem cells to neurons and glia: A Soxist’s view of neural development. *Trends Neurosci* **28**: 583–588.
- Welcher AA, Suter U, De Leon M, Snipes GJ, Shooter EM. 1991. A myelin protein is encoded by the homologue of a growth arrests specific gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7195–7199.
- Wilson M, Koopman P, 2002. Matching SOX: partner proteins and co-factors of the SOX family of transcriptional regulators. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **12**: 441–446.

- Winseck AK, Oppenheim RW. 2006. An in vivo analysis of Schwann cell programmed cell death in embryonic mice: the role of axons, glial growth factor, and the pro-apoptotic gene Bax. *Eur J Neurosci* **24**: 2105–2117.
- Woldeyesus MT, Britsch S, Riethmacher D, Xu L, Sonnenberg- Riethmacher E, Abou-Rebyeh F, Harvey R, Caroni P, Birchmeier C. 1999. Peripheral nervous system defects in erbB2 mutants following genetic rescue of heart development. *Genes Dev* **13**: 2538–2548.
- Wolpowitz D, Mason TB, Dietrich P, Mendelsohn M, Talmage DA, Role LW. 2000. Cysteine-rich domain isoforms of the neuregulin-1 gene are required for maintenance of peripheral synapses. *Neuron* **25**: 79–91.
- Wood P, Moya F, Eldridge C, Owens G, Ranscht B, Schachner M, Bunge M, Bunge R. 1990. Studies of the initiation of myelination by Schwann cells. *Ann NY Acad Sci* **605**:1–14.
- Wrabetz L, Taveggia C, Feltri M, Quattrini A, Awatramani R, Scherer S, Messing A and Kamholz J. 1998. A minimal human MBP promoter-*lacZ* transgene is appropriately regulated in developing brain and after optic enucleation, but not in shiverer mutant mice. *J. Neurobiol.* **34**: 10–26.
- Wright EM, Snopek B, Koopman P. 1993. Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res.* **21**: 744.
- Xu H, Wu XR, Wewer UM, Engvall E. 1994. Murine muscular dystrophy caused by a mutation in the laminin alpha 2 (Lama2) gene. *Nat Genet* **8**:297–302
- Yang D, Bierman J, Tarumi YS, Zhong YP, Rangwala R, Proctor TM, Miyagoe-Suzuki Y, Takeda S, Miner JH, Sherman LS, et al. 2005. Coordinate control of axon defasciculation and myelination by laminin- 2 and -8. *J Cell Biol* **168**: 655–666.
- Yasuda K, Kawano H, Yamane I, Ogawa Y, Yoshinaga T, Nishikawa M, Takakura Y. 2004. Restricted cytokine production from mouse peritoneal macrophages in culture in spite of extensive uptake of plasmid DNA, *Immunology* **111**: 282–290
- Yi. R, Doehle B. P, Qin Y, Macara I G, Cullen B.R. 2005. Overexpression of Exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs, *RNA*. **11**: 220–226
- Yin X, Crawford TO, Griffin JW, Tu P, Lee VM-Y, Li C, Roder J, Trapp BD. 1998. Myelin-associated glycoprotein is a myelin signal that modulates the caliber of myelinated axons. *J Neurosci* **18**: 1953– 1962.
- Yin Y, Kikkawa Y, Mudd JL, Skarnes WC, Sanes JR, Miner JH. 2003. Expression of laminin chains by central neurons: Analysis with gene and protein trapping techniques. *Genesis* **36**: 114–127.
- Yin, X., G. Kidd, L. Wrabetz, M. Feltri, A. Messing, and B. Trapp. 2000. Schwann cell myelination requires timely and precise targeting of P0 protein. *J. Cell Biol.* **148**:1009–1020.

Yokoyama A, Wang Z, Wysocka J, Sanyal M, Aufiero DJ, Kitabayashi I, Herr W, Cleary ML. 2004. Leukemia proto-Oncoprotein MLL forms a SET1-like histone methyltransferase complex with menin to regulate Hox gene expression. *Mol Cell Biol* **24**: 5639–5649.

Yoon C, Korade Z, Carter BD. 2008. Protein kinase A-induced phosphorylation of the p65 subunit of nuclear factor- κ B promotes Schwann cell differentiation into a myelinating phenotype. *J Neurosci* **28**:3738–3746.

Yoshida H, Nishikawa M, Yasuda S, Mizuno Y, Takakura Y. 2008. Cellular activation by plasmid DNA in various macrophages in primary culture, *J. Pharm. Sci.* **97**: 4575–4585

Yu WM, Feltri ML, Wrabetz L, Strickland S, Chen ZL 2005. Schwann cell-specific ablation of laminin gamma1 causes apoptosis and prevents proliferation. *J Neurosci* **25**: 4463– 4472.

Yu WM, Yu H, Chen ZL. 2007. Laminins in peripheral nerve development and muscular dystrophy. *Mol Neurobiol* **35**:288–297

Yurchenco PD, Amenta PS, Patton BL. 2004. Basement membrane assembly, stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol* **22**: 521–538.

Zeng Y, Cullen BR. 2002. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm, *RNA* **8**: 855–860

Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T. & Takeda S. et al. 2001. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* **105**: 587–597

Zhong H, Voll RE, Ghosh S. 1998. Phosphorylation of NF-Kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol Cell* **1**:661–671.

Zhu D, Kennerson ML, Walizada G, Zuchner S, Vance JM. & Nicholson GA. (2005) Charcot-Marie-Tooth with pyramidal signs is genetically heterogeneous: families with and without MFN2 mutations. *Neurology* **65**: 496–497.

Zoidl G, D'Urso D, Blass-Kampmann S, Schmalenbach C, Kuhn R, Muller HW. 1997. Influence of elevated expression of rat wild-type PMP22 and its mutant PMP22 trembler on cell growth in NIH3T3 fibroblasts. *Cell Tissue Res* **287**: 459–470.

Zorick TS, Syroid DE, Brown A, Gridley T, Lemke G.1999. Krox- 20 controls SCIP expression, cell cycle exit and susceptibility to apoptosis in developing myelinating Schwann cells. *Development* **126**: 1397–1406.

Züchner S. & Vance JM. 2006. Molecular genetics of autosomaldominant axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* **8**: 63–74.

Züchner S, Noureddine M, Kennerson M, Verhoeven K, Claeys K. & De Jonghe P. et al. 2005. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate harcot-Marie-Tooth disease. *Nature Genet* **37**: 289– 294.

Sites web: <http://s2.e-monsite.com/2009/11/15/26288300anatomie-et-physiologie-du-sn-pdf.pdf>

http://www.google.fr/#gs_rn=17&gs_ri=psy-ab&pq=cellule%20nerveuse%20d%C3%A9finition&cp=7&gs_id=2b&xhr=t&q=neurones&e_s_nrs=true&pf=p&sclient=psy-ab&oq=neurone&gs_l=&pbx=1&bav=on.2,or.r_qf.&fp=145429bae158cf49&biw=1366&bih=667

http://www.infovisual.info/03/040_fr.html

http://en.wikipedia.org/wiki/Myelin_basic_protein

Fiches techniques

Fiche technique N°1: Protocole d'extraction d'ARNm de culture cellulaire

Milieux et réactifs :

Qiazol lysis reagent (*QIAGEN*)
Chloroforme
Ethanol
RNeasy Mini column (*QIAGEN*)
Buffer RWT (*QIAGEN*)
Buffer RPE (*QIAGEN*)
RNase-free water (*QIAGEN*)

Technique

- 1) Ajouter 700 µl de réactif Qiazol de lyse à la plaque de culture, décoller les cellules avec un grattoir en caoutchouc. Pipeter le lysat de cellules dans un tube eppendorf. Vortexer pour mélanger jusqu'à disparition des agrégats cellulaires.
- 2) Placer sur la paillasse le tube contenant l'homogénat à température ambiante (15-25°C) pendant 5 minutes.
- 3) Ajouter 140 µl de chloroforme dans le tube, pendant 15 secondes et placer une nouvelle fois le tube à température ambiante pendant 2 à 3 minutes.
- 4) Centrifuger pendant 15 minutes à 12000g à 4°C. Après la centrifugation, l'échantillon est séparé en trois phases : la phase aqueuse incolore à la limite supérieure contenant les ARN, une phase blanche intermédiaire et en dessous la phase organique qui est rouge. Le volume de la phase aqueuse est approximativement égal à 350 µl.
- 5) Transférer la phase aqueuse dans un nouveau tube collecteur (fourni dans le kit). Ajouter 1,5 volume d'éthanol 100% et mélanger soigneusement en pipetant au dessus et en dessous plusieurs fois.
- 6) Pipeter 700 µl de l'échantillon dans un tube collecteur de 2 ml de RNeasy Mini spin. Centrifuger à 10 000 rpm pendant 15 secondes à température ambiante (15-25°C) puis jeter le réceptacle.
- 7) Ajouter 700 µl de tampon RWT à la colonne RNeasy Mini spin puis centrifuger pendant 15 secondes à 10 000 rpm puis jeter le réceptacle.
- 8) Pipeter 500 µl de tampon RPE sur la colonne RNeasy Mini spin et centrifuger à 10 000 rpm pendant 15 secondes. Jeter le réceptacle.

- 9) Ajouter de nouveau 500 µl de tampon RPE à la colonne. Centrifuger pendant 2 minutes à 10 000 rpm.
- 10) Placer la colonne de RNeasy Mini spin dans un nouveau tube collecteur de 2 ml et centrifuger à 12000 rpm pendant 1 minute.
- 11) Transférer enfin la colonne dans un nouveau tube collecteur. Deposer 30 µl de RNeasy free water sur la membrane de la colonne puis centrifuger pendant 1 minute pour éluer l'ARN.

Fiche technique n°2 : Protocole d'extraction d'ARNm de nerf sciatique de rat

Kit et Réactif

RNeasy Plus Universal kit (Reference 73404)

Qiazol lysis reagent

Protocole

Préparer un tube eppendorf 2 ml avec 3 billes ainsi que 2 tubes eppendorf 1.5 ml et une colonne pour un échantillon.

Decouper au scalpel le nerf de rat conservé dans du RNA later. Ajouter 900 µl de Qiazol.

Broyer 2x2 minutes, si nécessaire broyer une ou deux fois de plus.

Recupérer le broyat dans une seringue de 1 ml et le transvaser dans un tube de 1.5ml

Recupérer les billes dans un tubes pour nettoyage

Ajouter 100µl de gDNA Eliminator solution. Bien boucher puis agiter vigoureusement pendant 15 secondes

Ajouter 180µl de chloroforme. Agiter vigoureusement. Laisser reposer 2-3 minutes.

Centrifuger à 12000 tours/minute pendant 15 minutes à 4°C

Transférer le surnageant en évaluant le volume (pipette de 100µl) dans un tube de 1.5ml.

Ajouter 1 volume d'éthanol 70%, mélanger à la pipette. Ne pas centrifuger.

Transférer sur une colonne 700µl. Centrifuger 15 secondes à 10 000 tours/minute.

Jeter l'éluat. Idem pour le restant.

Ajouter 700µl de RWT. Centrifuger 15 secondes à 10 000 tours/minute

Ajouter 500µl de RPE. Centrifuger 15 secondes à 10 000 tours/minute

Ajouter 500µl de RPE. Centrifuger 2 minutes à 10 000 tours/minutes

Changer de tube collecteur. Centrifuger 1 minute à 13 000 tours/minute.

Placer sur un tube eppendorf de 1.5 ml. Eluer avec 30µl de RNase free water.

Laisser en contact 1 minute puis centrifuger pendant 1 minute à 13 000 tours/minute.

Congéler à -80°C

Fiche technique N°3 : Protocole de RT-PCR

Réactifs et milieux:

ADN matrice

Reverse transcriptase quantiscript (*QIAGEN*)

Tampon RT quantiscript (*QIAGEN*)

Mix Primers RT ((*QIAGEN*)

RNase free water (*QIAGEN*)

gDNA Wipeout Buffer, 7x (*QIAGEN*)

FastLane lysate (*QIAGEN*)

Technique

Protocole de RT-PCR

- 1) Décongeler l'ADN matrice, le tampon d'inhibition gDNA, la reverse transcriptase quantiscript, le tampon RT quantiscript, le mix de primer RT et la RNase free water à la température ambiante (15-25°C).

Mélanger chaque solution en tournant les tubes, centrifuger un peu pour récupérer le liquide résiduel des côtés puis conserver sur de la glace.

- 2) Préparer la réaction d'élimination de l'ADN génomique sur de la glace selon le tableau 1.

Tableau1 : Composition du milieu d'élimination de l'ADN génomique

Composant	Volume/réaction	concentration
gDNA Wipeout Buffer, 7x	2 µl	1x
FastLane lysate	1-4µl	
RNase-free water	variable	
Volume total	14 µl	-

3. Incuber pendant 2 minutes à 42°C puis placer immédiatement sur de la glace.
Préparer le mix principal de la reverse transcription selon le tableau 2.

Tableau 2. Composants de la réaction de reverse transcription

Composants	Volume/réaction	Concentration finale
Reverse transcription master mix		
Quantiscript Reverse Transcriptase	1µl	1x
Quantiscript RT Buffer, 5x	4µl	
RT Primer mix	1µl	
Template RNA		
FastLane Lysate	14µl	
Total volume	20µl	-

Incuber au thermocycleur pendant 15 minutes à 42°C puis pendant 3 minutes à 95°C pour inactiver la reverse transcriptase.

Fiche technique n°4 Protocole de quantification d'ARNm à partir des cDNA

La quantification est réalisée au rotor gene conformément au manuel d'utilisation à 3 cycles, une denaturation à 95°C, une hybridation à 62°C et une extension à 72°C. La PCR est d'abord incubé à 95°C pendant 5 minutes pour activer l'ADN polymérase. Le mix réactionnel est réalisé selon le tableau suivant :

Composants	Volume réactionnel	Concentration finale
2xRotor gene SYBR Green PCR Master Mix	12.5µl	1x
Forward+ reverse primers	1µl	1µM
cDNA	2µl	≤100 ng/reaction
RNAse free water	9.5µl	
Volume totale de la réaction	25µl	

Fiche technique N°5 Protocole d'immunomarquage de la protéine MBP (Myelin Basic Protein)

Milieux et réactifs:

Paraformaldéhyde

PBS (Phosphate-Buffer-Saline) 1x

Triton x-100

BSA (Bovine Serum Albumine)

Anticorps anti MBP SMI94 (Monoclonal mouse antibody)

Anticorps secondaire (Goat anti mouse alexa-F 488)

Hoechst (bisbenzimidazole)

Technique

1. Fixer la culture des cellules de DRG dans du paraformaldéhyde 4% dissout dans du PBS 1x
2. Rincer 4x5 minutes au PBS
3. Perméabiliser avec du PBS à 0,5% triton x-100 pendant 5 minutes à température ambiante
4. Faire la saturation avec du PBS 1x à 3% BSA pendant 30 minutes à température ambiante
5. Mettre l'anticorps primaire MBP SMI 94 (monoclonal mouse antibody) dilué à 1/1000 dans de la BSA 1,5% et incuber pendant une nuit à 4°C à l'abri de la lumière.
6. Rincer au PBS 4x5 minutes sous agitation à température ambiante
7. Mettre l'anticorps secondaire (goat anti mouse Alexa-F 488) dilué à 1/1000 dans du PBS à 3% de BSA puis incuber pendant 2 heures à température ambiante à l'abri de la lumière
8. Rincer 4x5 minutes au PBS
9. Mettre le hoechst dilué au 1/5000 dans du PBS1x et incuber pendant 5 minutes
10. Rincer au PBS une dernière fois 4x5 minutes

Fiche technique N°6 : Protocole de dissection des ganglions rachidiens postérieurs d'embryons de rat

Matériels, milieux et réactifs:

Rate gestante de 15-17 jours

Deux boîtes de pétri de 100 mm de diamètre

L15 medium (*GIBCO*)

Du matériel de microchirurgie (pinces, ciseaux, bistouris, etc.....)

Un tube eppendorf

Technique

Dater la gestation de la rate à partir du frottis des spermatozoïdes du rat. Un frottis positif sera daté E0 pour la gestation. A E17 :

- Anesthésier la rate grâce à un mélange d'isoflurane, d'air et d'oxygène
- Enlever l'utérus contenant les embryons et le placer dans une boîte de pétri de 100 mm de diamètre contenant 5 ml de L15 frais
- Prelever les embryons et les mettre dans une nouvelle boîte de pétri de 100 mm de diamètre contenant 5 ml de L15
- Décapiter les embryons et les déposer en décubitus dorsal, les pattes sous l'abdomen, ce qui l'arrondit et favorise l'exposition de la moelle
- Fixer l'embryon avec deux épingles, une caudale et une céphalique
- Faire une incision cutanée aux ciseaux, reclinier la peau latéralement
- Inciser puis extraire la moelle
- Extraire les ganglions rachidiens de leur logette au biver ophtalmique, les saisir à la pince puis les mettre dans un tube eppendorf de 1,5 ml contenant du L15 frais

Remarque : La durée du prélèvement ne doit pas excéder 2 heures

Fiche technique n°7 Protocole de coating des plaques au matrigel

Matrigel Basement Membrane Matrix (B. Dickinson, catalogue number 354234)

Des plaques 12 puits

Technique

- Diluer le matrigel 1 :3 dans du L15
- Déposer 120 µl par puits de plaques 12 puits
- Etaler avec une raclette

Remarque : Pendant le coating, le matrigel doit être gardé sur de la glace pour éviter sa solidification. Après le coating, garder les plaques à l'étuve à 37°C puis commencer le prélèvement des DRG.

Fiche technique N°8 Digestion des DRG

Matériels, milieux et réactifs:

Du L15 medium (GIBCO, Reference: 11415-049)

De la trypsine 10x

Du serum de veau fœtal

Technique

- Mettre les DRG dans un tube eppendorf contenant du L15 à 0.25% de trypsine, puis à agiter au four à hybrider à 37°C pendant 15 minutes.
- Assurer mécaniquement la dissociation des cellules avec une pipette pasteur jusqu'à ce que les grands fragments disparaissent. Laver les cellules avec du L15 à 10% de sérum de veau fœtal pour stopper l'activité de la trypsine puis centrifuger à 800 rpm
- Laver 2 fois la suspension cellulaire avec du L15 frais pour éliminer les grands résidus et les débris
- Recupérer les cellules dans 1ml de milieu de culture puis compter à la lame de Malassez.

Fiche technique N°9 Ensemencement et nutrition des cellules

Matériels, milieux et réactifs:

Les cellules de DRG d'embryons E17

Du milieu de culture composé de :

Neurobasal medium (GIBCO, Reference 21103-049)

2% de B27 supplement 50x (GIBCO, Reference 17504-044)

0, 3% de Glutamax 100x (GIBCO, Reference A12860)

100 ng/ml NGF 2,5S (B.Dickinson, Reference 356004)

1% de peni-streptomycine (Reference 15140-122)

Technique

- Après la digestion, resuspendre le culot cellulaire dans du milieu de culture
- Prelever 30µl et compter à la lame de Malassez
- Ensemencer à $1-5 \cdot 10^4$ cellules/ml
- Garder les cellules dans le même milieu de culture pendant 5 jours
- Changer le milieu au 7^{ème} jour avec du milieu contenant 50 µg/ml d'acide ascorbique
- Ce milieu est ensuite changé tous les trois jours

Fiche technique n° 10: Technique de fixation de nerf sciatique de rat pour une observation au microscope électronique

- Fixateur : 9 mL de tampon Soerensen + 1 mL de glutaraldéhyde sigma à 25%
- Plonger les nerfs (fragments de 1 à 2 mm³) dans le fixateur puis laisser fixer pendant 12 heures à 4°C
- Rincer les nerfs avec du tampon Soerensen
- Garder les échantillons au réfrigérateur
- Plonger les échantillons dans un mélange volume à volume d'acide osmique à 2% et de tampon palade pendant 24 heures à 4°C
- Rincer au tampon palade

Fiche technique n°11 : Technique d'inclusion en araldite de nerf sciatique de rat

Préparation de la résine:

Epon 812 : 25 ml

D.D.S.A : 55 mL

Araldite : 15 mL

Dibutyl Phthalate: 3 mL

Cette résine se conserve à -20°C dans des seringues de 20 mL

Déshydratation

Après la fixation, faire une déshydratation des échantillons dans de l'acétone (dilué dans de l'eau) à différentes concentrations :

Acétone à 25% pendant 10 minutes
Acétone à 50% pendant 10 minutes
Acétone à 50% pendant 10 minutes
Acétone à 70% pendant 10 minutes
Acétone à 90% pendant 10 minutes
Acétone à 90% pendant 10 minutes
Acétone pure pendant 15 minutes
Acétone pure pendant 20 minutes
Acétone pure pendant 20 minutes

Substitution

Faire une substitution dans un mélange d'acétone et de résine à différentes concentrations :

Acétone + 25% de résine pendant une heure
Acétone + 50% de résine pendant 5 heures
Acétone + 50% de résine pendant 5 heures
Acétone + 75% de résine pendant 2 heures

Imprégnation

Après la substitution, plonger les échantillons dans de la résine pure pendant 3 heures à 20°C puis pendant 3 heures à température ambiante dans de la résine à 3% de DMP30

Inclusion

Etiqueter les prélèvements, mettre une goutte de résine au fond de chaque gélule (+ 3% de DMP30) et y déposer le prélèvement puis recouvrir de résine (+3% de DMP30) ; bien orienter le prélèvement.

Polymérisation

Laisser la résine polymériser pendant 48 heures à 60°C

Fiche technique n°12 : Injection de siARN dans les nerfs de rat

- Anesthésier le rat par inhalation d'isoflurane mélangé à de l'air liquide et de l'oxygène
- Fixer les pattes, raser et inciser la peau.
- Inciser ensuite le muscle (le nerf est ainsi rendu visible)
- Mettre un écarteur pour faciliter l'accès au nerf.
- Injecter sous loupe binoculaire grâce à une micro-seringue graduée de 10 µl à 100 µl (le point d'injection est situé au-dessus de la bifurcation du nerf dans la partie mono-fasciculaire).

- Faire un repère avec un fil de suture non résorbable fixé à la hauteur du point d'injection sur le muscle latéral.
- Refermer le muscle et la peau avec des agrafes.
- Remettre le rat dans sa cage (il retrouve aussitôt sa mobilité)
- Anesthésier de nouveau la rate 5 jours après l'injection et prélever les nerfs sciatiques (de manière à avoir une partie du nerf avant et après la marque faite avec le fil de suture)
- L'animal est enfin sacrifié par une injection de ketamine intra-cardiaque.